DAS BINDUNGSVERHALTEN VON HUMANSERUMALBUMIN BEI PATIENTEN MIT TERMINALER NIERENINSUFFIZIENZ

Wolfgang von Prittwitz und Gaffron

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523705_0028

Aus dem Zentrum der Pharmakologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main
Abteilung Klinische Pharmakologie
Leiter: Professor Dr.med.N.Rietbrock

DAS BINDUNGSVERHALTEN VON HUMANSERUMALBUMIN BEI PATIENTEN MIT TERMINALER NIERENINSUFFIZIENZ

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Wolfgang von Prittwitz und Gaffron
aus Frankfurt/Main

Frankfurt am Main, 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. H.J. Müller

Referent: Professor Dr. med. N. Rietbrock

Korreferent: Professor Dr. rer. nat. K. Ring

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.1983

Druck: Dipa - Druck, 6000 Frankfurt, Tel. 55 61 88

A b s t r a c t

ON PRITTWITZ UND GAFFRON, WOLFGANG:

AS BINDUNGSVERHALTEN VON HUMANSERUMALBUMIN BEI PATIENTEN
IT TERMINALER NIERENINSUFFIZIENZ

ie Bindungsstudien erfolgten mit Hilfe der stopped-flow-
eßapparatur, die eine kinetische Auswertung der aufge-
eichneten Fluoreszenz der Bindung zwischen Dansylsarcosin
DS) und Humanserumalbumin (HSA) in den Seren von
ämodialysepatienten und nierengesunden Probanden er-
öglichte.

s konnte gezeigt werden, daß sich die Komplexierung der
indung von DS und HSA zwischen den Patienten und den
ierengesunden Probanden deutlich unterscheidet. Die
ffinitätskonstante des Anlagerungskomplexes DS-HSA',
elcher innerhalb von 3ms nach Zusammenbringen von Serum
nd DS bereits im Gleichgewicht vorliegt, ist für die
atientenseren kleiner ($K'_A=2{,}24\cdot10^4M^{-1}$) als für die Seren
ierengesunder Probanden ($K'_A=4{,}31\cdot10^4M^{-1}$). Im Patienten-
erum ist die Halbwertszeit der Umlagerung in den Endkomplex
S-HSA, $\overrightarrow{t_{1/2}}=7{,}9$ms und dessen Dissoziationhalbwertszeit,
$\overleftarrow{t_{1/2}}=25{,}7$ms ($K_A=0{,}724\cdot10^5M^{-1}$) unterschiedlich zu den mit
eren der Probanden ermittelten kinetischen Parametern:
$\overrightarrow{t_{1/2}}=3{,}4$ms, $\overleftarrow{t_{1/2}}=46{,}2$ms, ($K_A=5{,}9\cdot10^5M^{-1}$). Da im Serum des
rämikers die Bildung des Anlagerunskomplexes reduziert
ar, die Umwandlung in den Endkomplex langsamer und dessen
issoziation schneller erfolgte, resultierte eine vermin-
erte Komplexierung von DS und HSA im Vergleich zu den
ierengesunden.

ie beschriebenen Veränderungen legen nahe, daß endogene
ubstanzen im Serum der Urämiepatienten vorliegen, die
llosterische Wechselwirkungen mit DS am HSA und/oder
onformationsänderungen des HSA hervorrufen.

VORBEMERKUNG

Bei unseren Vorversuchen mit der stopped-flow Meßapparatur, welche ich Ende 1979 mitaufbaute und in den folgenden Jahren mitverbesserte, zeigten sich in der Anfangsphase große Schwierigkeiten, das Meßsignal (die Fluoreszenz der Komplexierung von Pharmakon und Albumin) zu optimieren. Diese Schwierigkeiten sind heute größtenteils beseitigt. Um das Bindungsverhalten des Albuminmoleküls für Pharmaka in Seren von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz nachzuvollziehen, erfolgten auch eigene Arbeiten am Analogcomputer.

Meiner Mutter

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	Einleitung	3
1.1.	Das Albuminmolekül als Acceptor	4
1.2.	Pathogenese des urämischen Syndroms	7
1.3.	Beladung der Bindungsstellen des Albumins bei terminaler Niereninsuffizienz	9
1.4.	Fragestellung	11
2.	Material und Methode	12
2.1.	Patienten	12
2.2.	Analytische Messungen	14
2.3.	Verwendete Reagenzien	17
2.4.	Geräte	17
2.5.	Qualitative und quantitative Bestimmung der Proteinbindung	18
2.6.1.	Prinzip der stopped-flow Messungen	20
2.6.2.	Berechnung der Affinitätskonstanten und der kinetischen Parameter über die gemessene Fluoreszenz	23
3.	Ergebnisse	28
3.1.	Komplexierung von DS und HSA bei gesunden Versuchspersonen	28

3.2.	Komplexierung von DS und HSA bei terminaler Niereninsuffizienz	29
3.3.	Korrelation zwischen Bindungskonstanten und Laborparametern bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz	32
4.	Diskussion	36
4.1.	Veränderte Bindung von DS und HSA bei terminaler Niereninsuffizienz	36
4.2.	Triglyceride, Cholesterin und Cholesterinester bei terminaler Niereninsuffizienz	39
4.3.	Die Lipidelektrophorese und die freien Fettsäuren bei terminaler Niereninsuffizienz	43
5.	Zusammenfassung	48
	Literatur	50
	Abkürzungen	64
	Anhang	65
	Danksagung	76
	Ehrenwörtliche Erklärung	77
	Lebenslauf	78

1. EINLEITUNG

Bei Urämiepatienten wurde von zahlreichen Autoren eine Abnahme der Bindung für Pharmaka z.B. von Diazepam, Coumarinderivaten und Diphenylhydantoin nachgewiesen (4,30,47).

Zur Ermittlung des Bindungsverhaltens wurden die Gleichgewichtsdialyse, die Ultrazentrifugation, die Sephadexgelfiltration u.a. verwendet, die eine Bestimmung der Bindung eines Pharmakons an das Albuminmolekül nur im stabilen Gleichgewicht ermöglichen. Mit Hilfe der stopped-flow Meßapparatur hingegen kann der gesamte Verlauf der Bindung eines Pharmakons an das HSA aufgezeichnet werden. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf die während der Komplexierung zwischen Pharmakon und HSA auftretenden Bindungskräfte ziehen. Die stopped-flow Messungen erlauben daher im Gegensatz zu den obengenannten Verfahren eine kinetische Auswertung.

1.1. DAS ALBUMINMOLEKÜL ALS ACCEPTOR

Unter Acceptoren bzw. Bindungsstellen werden allgemein Makromoleküle oder Teile bzw. Abschnitte davon im Organismus verstanden, welche in der Lage sind, exogene (z.B. Pharmaka) und endogene (z.B. Hormone) Substanzen zu binden. Dabei wird zwischen spezifischen und unspezifischen Bindungsstellen unterschieden. Die spezifische Phamakonwirkung beruht in den meisten Fällen auf der Wechselwirkung des Pharmakons mit einem Acceptorareal des Albumins, welche mit physikochemischen Methoden charakterisiert werden kann. Es wurden bereits Acceptorareale des Albumins charakterisiert, deren exakte Struktur aber bislang noch nicht bekannt ist (1,4,8,11,17,24,29,30,32,37,48,57,60-63, 70). Ob und in welchem Ausmaß ein Komplex gebildet wird, hängt von der Affinität des Pharmakons zur Bindungsstelle ab. Ein Maß hierfür stellt die Affinitätskonstante dar, welche die Festigkeit, mit der das Pharmakon gebunden wird, beschreibt.

Für die Bindung kommen prinzipiell alle Bindungsarten in Betracht, wie beispielsweise Ionenbindungen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechsel-

wirkungen (durch van der Waals'sche Kräfte). Fast immer werden Bindungen verschiedener Typen gleichzeitig eingegangen. Durch hydrophobe Wechselwirkungen werden unpolare Moleküle oder Gruppen von Molekülen in wäßrigem Milieu zu größeren Aggregaten zusammengeschlossen. Es ist energetisch ungünstiger, wenn sich Wassermoleküle um einen unpolaren (hydrophoben) Molekülteil anordnen, als wenn sie mit polaren Gruppen oder anderen Wassermolekülen in Wechselwirkung (H-Brücken) treten können. Die Wassermoleküle müssen aus Gründen einer Entropieerniedrigung um einen hydrophoben Rest herum eine geordnete Struktur einnehmen. Um den Anteil der hydrophoben Oberfläche von Molekülen, der dem Wasser zugewandt ist, möglichst klein zu halten, werden die hydrophoben Reste vom umgebenden Wasser gezwungen, sich aneinander zu lagern, und das Wasser zwischen ihnen wird herausgedrängt. Zwischen den so aneinandergelegten hydrophoben Resten bilden sich van der Waals'sche Wechselwirkungen aus.

Für die primäre Phase des Zusammentretens von Pharmakon und der Bindungsstelle sind Ionenbindungen von entscheidender Bedeutung, da ihre Bindungskräfte die

größte Reichweite besitzen, verglichen mit anderen Bindungskräften. Für die sich anschließende Komplexstabilisation durch Ausbildung einer Strukturkomplementarität sind dagegen vor allem Dipol-Dipol, Wasserstoffbrücken- und hydrophobe Bindungen verantwortlich. Diese tragen zur Fixierung des Pharmakons am Acceptorareal des Albuminmoleküls maßgeblich bei.

Unter kompetitiver Wechselwirkung ist das Konkurrieren von zwei Pharmaka um dieselbe Bindungsstelle zu verstehen. Nach dem Massenwirkungsgesetz kann jeweils durch Erhöhung der Konzentration des einen Stoffes der andere aus der Bindungsstelle verdrängt werden. Allosterische Wechselwirkungen können auftreten, wenn der zweite Ligand nicht am eigentlichen Acceptorareal, sondern an einer anderen Molekülstelle gebunden wird. Diese kommt dadurch zustande, daß durch eine Konformationsänderung des Makromoleküls die Bedingungen für die Bindung an das Acceptorareal verschlechtert werden.

Albumin besitzt ein Molekulargewicht von 69000 und eine Plasma-Halbwertszeit von etwa 26 Tagen. Es liegt in folgender Tertiärstruktur vor:

3 lange Helices, durch Disulfidbrücken miteinander verbunden und kurzen hydrophoben Resten (bestimmte Aminosäuren, wie z.B. Leucin) zwischen den Helices. Polare Reste des Moleküls liegen an seiner Oberfläche, unpolare im Inneren.

Eine große Zahl von Pharmaka und Stoffwechselprodukten, Hormonen und dgl. binden am HSA. Hier sollen genannt werden: unveresterte Fettsäuren, Bilirubin, L-Thyroxin, L-Thryptophan, Hämin und verschiedene Elektrolyte oder anionische Pharmaka wie Warfarin und Diazepam, die unterschiedliche Bindungsstellen am HSA besitzen. Zur Zeit werden mindestens 6 Bindungsregionen am HSA diskutiert (32).

1.2. PATHOGENESE DES URÄMISCHEN SYNDROMS

Durch unterschiedliche Noxen (Infekte, Autoimmunprozesse, Pharmaka und andere chemische Stoffe) kann es zu fortschreitendem irreversiblen Ausfall funktionstüchtiger Nephrone kommen. Auf die Bildung des Glomerulusfiltrates wirkt sich der Schrumpfungsprozeß in der Weise aus, daß durch Verminderung der

Anzahl funktionstüchtiger Nephrone die gesamte zur Filtration befähigte Glomerularoberfläche beider Nieren progressiv verkleinert, und damit der Filtrationsprozeß unabhängig von weiteren Krankheitsfaktoren eingeschränkt wird. Das Endstadium stellt die Urämie dar. Nach den Statistiken der europäischen Dialyse- und Transplantationsgesellschaft (18) für das Jahr 1979 ergab sich folgende prozentuale Verteilung der primären Nierenerkrankungen bei zur Dauertherapie aufgenommenen Patienten mit Urämie:

Diagnose	1979
Chronische Glomerulonephritis	30,7%
Pyelo-(interstitielle) Nephritis	21,2%
Ätiologie unbekannt	11,1%
Systemerkrankungen	10,8%
Zystennieren	9,2%
Renovaskuläre Erkrankungen	7,6%
Drogen-Nephropathie	3,5%
andere	3,4%
Heredo-familiäre Nephritis	2,5%

Abhängig von der Grundkrankheit kann sich die Niereninsuffizienz (NI) verschieden schnell ausbilden. Mit

fortschreitender NI beherrschen urämische Symptome das Bild. Diese erklären sich :

a) durch den Ausfall der exkretorischen Nierenfunktion: Hier steht die Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (Anstieg der harnpflichtigen Substanzen) und von tubulären Leistungen (Retention von Wasser, Natrium, sauren Valenzen, Phosphat) im Vordergrund.

b) durch eine Störung der inkretorischen Nierenfunktion: Hierunter fällt die Bildung von Erythropoetin und aktivem Vitamin D und die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems. Liegt das Vollbild einer terminalen NI vor, so ist meist die Funktion aller lebenswichtigen Organe gestört.

1.3. BELADUNG DER BINDUNGSSTELLEN DES ALBUMINS BEI TERMINALER NIERENINSUFFIZIENZ

Im Stadium der Urämie kann die Bindung endogener und exogener Substanzen an Albumin einerseits durch quantitative Verminderung dieses Serumproteins eingeschränkt werden, andererseits können allosterische und kompetitive Hemmprozesse hierbei eine Rolle spielen.

Cohen (12) postuliert verschiedene Möglichkeiten der Beeinflussung der Bindung an Albumin im Sinne einer absoluten und relativen Limitierung. Hier sollen genannt werden:

- Syntheseverminderung
  Bei der terminalen Niereninsuffizienz (TNI) ist die Synthese des Albumins vermindert. Durch die anfallenden urämischen Toxine wird die Leistungsfähigkeit der Leber eingeschränkt. Durch diese Einschränkung der Albuminsynthese kommt es zu einer absoluten Verminderung der Albuminbindungsstellen.
- Verminderung der Enzymaktivität der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT)
  Ein Endprodukt der von der LCAT katalysierten Reaktion, Lysolecithin, könnte seinerseits zu einer Hemmung der LCAT durch Produkthemmung führen, die dadurch eintritt, daß im Zusammenhang mit der TNI verfügbare Bindungsstellen am Albuminmolekül abnehmen, wodurch die Komplexierung des Lysolecithins mit Albumin in der Gesamtbilanz vermindert wird.

1.4. FRAGESTELLUNG

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist, zu zeigen, ob sich Unterschiede im Bindungsablauf für Dansylsarcosin zwischen Seren von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und den Seren eines nierengesunden Normalkollektives ergeben. Zur Charakterisierung der Stoffwechselstörung dient der Lipidstatus. Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, das Risiko in der Pharmakotherapie bei diesen Patienten zu minimieren.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. PATIENTEN

15 niereninsuffiziente Patienten, welche hämodialysiert wurden, wurden nach folgenden Kriterien in die Studie aufgenommen:

- männliches Geschlecht
- Alter zwischen 40 und 70 Jahren
- Serumalbuminkonzentration unter 4,5g%
- vergleichbarer Ernährungs- und Allgemeinzustand.

Ausgeschlossen wurden Patienten mit floriden Infekten, Aszites, Hepatopathien, Amyloidose und aktiven Malignomen.

Die Patientengruppe 1 umfaßt die Patienten 1-10, die Patientengruppe 2 die Patienten 11-14. Ein Patient konnte nicht berücksichtigt werden, da das Serum nach anfänglichen Meßschwierigkeiten nicht mehr für die Untersuchungen ausreichte. Die morgendliche Blutabnahme erfolgte am nüchternen Patienten vor der Dialyse.

Die Ergebnisse der klinisch-chemischen Untersuchungen der Patientenseren sind in Tab. 5 (Anhang) dargestellt

(für Leber, Niere und Elektrolyte). Beim Vorliegen einer Fettstoffwechselstörung wurde mittels der Lipidelektrophorese eine Zuordnung gemäß der Klassifizierung nach Fredrickson (21) zu den Typen I-IV getroffen. Bei den Urämikern fand sich überwiegend der Typ IV (Tab. 6, Anhang). Die Veränderungen der einzelnen Fraktionen der Lipidelektrophorese sowie die Serumkonzentration für die freien Fettsäuren, die Triglyceride und die Cholesterinkonzentration sind Tab. 6 zu entnehmen. Bei den Patienten fand sich als auslösende Grundkrankheit der terminalen Niereninsuffizienz 5x eine Pyelonephritis, 3x eine Glomerulonephritis, 2x eine Nephrosklerose, eine Zystenniere, und in 3 Fällen war die Ätiologie unklar (siehe Tab. 6 im Anhang). Aus Tab. 7 sind weiterhin der Zeitraum seit Beginn der Hämodialysebehandlung, die Serumalbuminkonzentration (4,08±0,23;3,7-5,4g/dl) und das Serumkreatinin der Urämiker (11,94±2,32;0,8-1,4mg/dl) zu ersehen. Die medikamentöse Therapie zum Zeitpunkt der Blutentnahme gibt Tab. 8 wieder.

Als Kontrollen dienten Seren von ausschließlich männlichen Probanden im Alter zwischen 24 und 62 Jahren, die weder eine bestehende Krankheit noch eine

Medikamenteneinnahme angaben, mit Ausnahme eines Probanden (Einnahme von Doxycyclin^{R}).

2.2. ANALYTISCHE MESSUNGEN

Die Bestimmungen der Vielfachanalyse (VA) und des Lipidstatus erfolgten im Zentrallabor des Universitätsklinikums Frankfurt. Die VA umfaßt die Laborparameter 1-14:

Laborparameter	Methode	Reagenzien bezogen durch
1. γ - GT	-kinetischer Test	-Fa. Boehringer Mannheim
2. GOT u. GPT	-optimierter Test	-Fa. Boehringer Mannheim
3. AP	-optimierter Test	-Fa. Boehringer Mannheim
4. Harnsäure	-Uricase	-Fa. Technicon
5. Harnstoff	-Diacetylmonoxim	-Fa. Technicon
6. Kreatinin	-Jaffé	-Fa. Technicon
7. Bilirubin	-Azobilirubin (Jendrassik-Grof)	-Fa. Technicon
8. Albumin	-Bromkresolgrün	-Fa. Technicon
9. Protein (gesamt)	-Biuret	-Fa. Technicon
10. Eisen	-Ferrozin	-Fa. Technicon
11. Calcium	-Cresolphthalein-Complexone	-Fa. Technicon

Fortsetzung:

12.Chlorid	-Quecksilber-rhodanid	-Fa. Technicon
13.Natrium u. Kalium	-Flammenemissions-photometrie	-Fa. Technicon
14.Glucose	-Glucose-Dehydro-genase	-Fa. Merck

Weiterhin vorgenommene Laboruntersuchungen:

15.Cholesterin u. freies Cholesterin	-CHOD-jodid	-Fa. Merck
16.Triglyceride	-Glycerokinase (vollenzymatisch)	-Fa. Boehringer Mannheim
17.Lipidelektro-phorese	-Polyanionenprä-zipitation auf Agarose	-Fa. Immuno

Die Laborparameter 1 bis 3 und 16 wurden mit dem Autoanalyser 5040 der Fa. Eppendorf bestimmt. Den Verfahren zur Bestimmung der genannten Laborparameter liegt jeweils eine kinetische Methode zugrunde, die durch eine optimale UV-Messung Ergebnisse mit einem Fehler unter 1% liefert.

Die Laborparameter 4-13 wurden mit dem Autoanalyser der Fa. Technicon bestimmt. Calcium, Natrium und Kalium wurden außerdem mit dem Flammenphotometer der Fa. Zeiss FL-6 bestimmt.

Die Untersuchung der Glucose (Laborparameter 14) wurde mit dem Glucose Analyser 2 der Fa. Beckmann vorgenommen. Die Ergebnisse wurden bestätigt mit denselben Reagenzien auf dem Autoanalyser II der Fa. Technicon.

Die Laborparameter 15 wurden mit dem Autoanalyser der Fa. Technicon unter Verwendung von Autonorm als Eichsubstanz bestimmt.

Zu Laborparameter 17: Die Auftrennung der Lipidelektrophorese erfolgte durch Polyanionenpräzipitation auf Agarose. Die Auswertung erfolgte am Desitometer, wodurch eine gute Auftrennung der einzelnen Fraktionen der Lipidelektrophorese erreicht wurde.

Die freien Fettsäuren (FFA) wurden bei der Fa. Bioscientia in Ingelheim nach der Methode von Trout und Mitarb. (64) bestimmt.

Cohen (12) berichtet von einer verminderten LCAT-

Aktivität bei Urämikern. Eine direkte Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Statt dessen wurden bei 6 der Patienten die Werte für freies und verestertes Cholesterin bestimmt.

Wir notierten die Anzahl der Stunden nach letzter Dialyse, da es in diesem Zeitraum möglicherweise im Blut der Patienten zu einer Kumulation von endogenen Substanzen kommt, die an Albumin binden.

2.3. VERWENDETE REAGENZIEN

Dansylsarcosin, Fa. Sigma, Lot Nr. 38 C-0353
Etacrynsäure, Fa. Sigma, Lot Nr. 129 C-0075
Lysolecithin, Fa. Sigma, Lot Nr. 1000 F-8350
Pufferlösung (pH 7,4) nach Sörensen - 0,1M Lösung

2.4. GERÄTE

- Durrum Gibson stopped-flow Apparatur
- Xenon-Hochdrucklampe (150W)

- Kantenfilter (Durrum 0-52)
- Speicheroszillograph Explorer III, Fa. Nicolet
- Computer HP 9815 A bzw. HP 85 der Fa. Hewlett Packard

2.5. QUALITATIVE UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER PROTEINBINDUNG

Zur Untersuchung der Proteinbindung im Bindungsgleichgewicht werden häufig die Gleichgewichtsdialysemessung, Ultrazentrifugation, Sephadexgelfiltration, Elektrophorese und der Plattentest benutzt. Das Prinzip dieser Verfahren beruht darauf, daß niedermolekulare Pharmaka von den makromolekularen Proteinmolekülen bzw. dem Protein-Pharmakon-Komplex im Gleichgewicht abgetrennt werden. Diese Verfahren dienen zur Ermittlung der Gleichgewichtskonstanten (34).

Stopped-flow Messungen erlauben im Gegensatz zu den obengenannten Verfahren eine kinetische Auswertung. Man erhält die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Albumin-Pharmakon-Komplexes und auch die Assoziationskonstante des jeweiligen Anlagerungskomplexes

K'_A, welche ein Maß für die Stärke der Bindung und die zur Verfügung stehenden Bindungsstellen darstellt. Diese Parameter gewähren direkten Einblick in den Mechanismus der Wechselwirkung verschiedener Liganden am HSA. Die stopped-flow Messungen zeichnen auch den zeitlichen Verlauf der Proteinbindung des Pharmakons auf und können damit zu Erkenntnissen führen, die mit den "klassischen" Verfahren nicht zugänglich sind. Die Kinetik der Bindung eines Pharmakons an Albumin liefert sowohl Aussagen über den eintretenden Gleichgewichtszustand als auch über Bindungskräfte, die im Verlauf der Komplexierung maßgeblich beteiligt sind (Abb. 2, Ergebnisteil).

2.6.1. PRINZIP DER STOPPED-FLOW MESSUNGEN

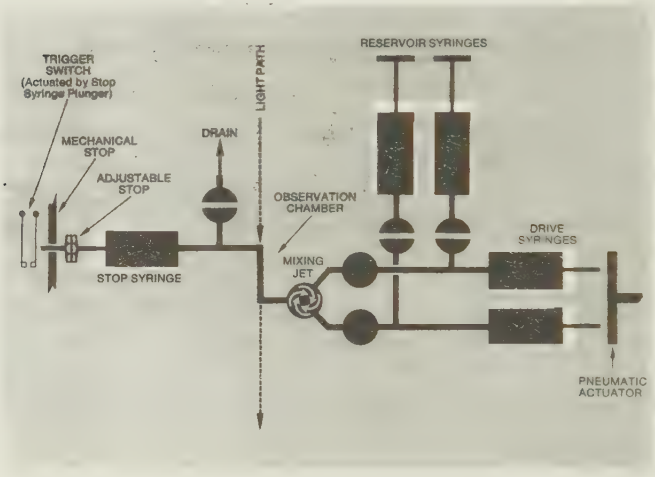

Abb. 1: Die Skizze zeigt die benutzte stopped-flow Meßapparatur im Schema (aus: Begleitheft zur stopped-flow Meßapparatur der Fa. Durrum).

Durch die fluoreszierende Substanz Dansylsarcosin kann die von uns untersuchte Bindungsstelle am Albuminmolekül markiert und dadurch näher charakterisiert werden. Um den zeitlichen Verlauf der Bildung des DS-HSA-Komplexes zu erfassen, bringt man die Reaktionslösungen Humanserumalbumin (HSA) und Dansylsarcosin (DS) unter hohem

Druck (5 Atm.) in eine Mischkammer (mixing jet). Die stopped-flow Meßapparatur ermöglicht es, Pharmaka und Proteinlösungen sehr schnell zu mischen (die Totzeit beträgt 3ms). Der Mischvorgang wird durch die Begrenzung eines Kolbens einer Spritze (stop syringe) gestoppt (adjustable stop). Die Reaktionslösungen wurden von der Mischkammer in die Meßzelle weitergeleitet. Das in die Meßzelle (observation chamber) eingestrahlte monochromatische Licht (lightpath) mit einer Anregungswellenlänge von 351nm trifft auf die sich mischenden Reaktionslösungen und wird von DS absorbiert. Die Fluoreszenz des DS-HSA-Komplexes wurde mit einem Photomultiplier (Durrum) bei Wellenlängen größer als 475nm gemessen. Bei der Anregung auftretendes Streulicht unterhalb von 475nm wurde vor dem Photomultiplier durch einen Kantenfilter (Durrum) eleminiert. Die gemessene Fluoreszenz für Lösungen aus unkomplexiertem HSA und DS und dem DS-HSA-Komplex sind Relativzahlen bezogen auf die Fluoreszenz von DS vor der Komplexierung mit HSA. Die bei den Messungen verwandten 0,1M Phosphatpuffer-

lösung und HSA- Lösungen zeigten getrennt vermessen unter den Versuchsbedingungen praktisch keine Fluoreszenz. Über die auf dem Oszillographen der Fa. Nicolet aufgezeichnete Fluoreszenzänderung kann eine Bestimmung kinetischer Parameter der Komplexierung von DS und HSA erfolgen (Abb. 5 und 6 im Anhang).

Für die stopped-flow Messungen wurde das Serum der Patienten 1-10 mit 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,4) auf eine Albuminkonzentration von 0,055 - $0{,}54 \cdot 10^{-4}$ M^{-1} in der Mischkammer eingestellt. Die verwendeten HSA-Konzentrationen der Patientenseren 11-14 gehen aus der Tab. 4 (Anhang) hervor. Die Konzentration des DS betrug jeweils $0{,}025 \cdot 10^{-4}$ M^{-1} in der Mischkammer. Bei den ausgeführten stopped-flow Messungen lag somit HSA im Überschuß vor. Mit der niedrigsten Albuminkonzentration

($0{,}055 \cdot 10^{-4} M^{-1}$) beginnend, wurde jeweils die Fluoreszenz des DS-HSA-Komplexes im Meßstrahlengang gemessen (Abb. 5; Anhang).

2.6.2. BERECHNUNG DER AFFINITÄTSKONSTANTEN UND KINETISCHER PARAMETER ÜBER DIE GEMESSENE FLUORESZENZ

Unter der Annahme einer hochaffinen Bindungsstelle des HSA für DS wurden die Werte des unkomplexierten HSA im Bindungsgleichgewicht ($c_{\overline{HSA}}$) für die eingesetzten HSA- und DS-Konzentrationen in Abhängigkeit von den Affinitätskonstanten ($K_A = 4 \cdot 10^4 M^{-1}$ bis $5 \cdot 10^6 M^{-1}$) berechnet. Diese Werte wurden auf einer Kassette gespeichert und dienten einem Rechner (HP 85) als Grundlage für einen Vergleich zur Ermittlung der Affinitätskonstanten.

Beginnend mit den gespeicherten Daten für $K_A = 4 \cdot 10^4 M^{-1}$, wurden die korrigierten Fluoreszenzwerte durch den berechneten Bindungsanteil

$$y = 1 \; / \; (\; 1 + (\; 1 \; / \; K_A \cdot c_{\overline{HSA}} \;))$$

dividiert, und somit wurde der bei einer 100%igen Bindung zu erwartende Fluoreszenzwert aus jeder Einzelmessung errechnet (=Fluoreszenzmaximum). Diese Fluoreszenzmaxima einer Meßreihe wurden gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Diese Berechnungen wurden mit den $c_{\overline{\overline{HSA}}}$ - Werten der nächsthöheren Affinitätskonstanten wiederholt, bis für die Standardabweichungen der jeweiligen Fluoreszenzmaxima ein Minimum gefunden worden war. Wir erhalten bei dieser Optimierung die Affinitätskonstante K_A des DS-HSA-Komplexes.

Nach der von Laßmann und Mitarb. (36) angegebenen Gleichung

$$(\text{I}) \qquad \frac{1}{k_{obs} - k_{-2}} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_2 \cdot K'_A \cdot \left(c_{\overline{\overline{HSA}}} + c_{\overline{DS}} \right)}$$

wurden für die Errechnung des Bindungsgleichgewichtes (Relaxation) der einzelnen Seren mit DS die kinetischen Konstanten der Reaktion

$$(\text{II}) \qquad DS + HSA \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} DS\text{-}HSA' \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} DS\text{-}HSA$$

ermittelt.

Erklärung der verwendeten Konstanten:

k_2 = Geschwindigkeitskonstante der Umlagerung des Anlagerungskomplexes (DS-HSA') in den stabilen DS-HSA-Komplex (1/Y-Achsenabschnitt).

k_{-2} = Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des stabilen DS-HSA-Komplexes.

k_1+k_{-1} = Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten des Anlagerungskomplexes DS-HSA'.

K'_A = Affinitätskonstante des Anlagerungskomplexes DS-HSA'.

K_A = Affinitätskonstante des stabilen DS-HSA-Komplexes ($K_A=K'_A \cdot k_2/k_{-2}$).

$k_2 \cdot K'_A$ = 1/Geradensteigung

k_{obs} = Relaxationskonstante (obs = observed)

DS = Dansylsarcosin

HSA = Humanserumalbumin

DS-HSA' = Anlagerungskomplex mit niedriger Affinität

DS-HSA = stabiler Endkomplex mit hoher Affinität

c_{HSA} = Konzentration des unkomplexierten HSA

c_{DS} = Konzentration des ungebundenen DS

Die Messung erfolgte nach Laßmann und Rietbrock (36). Mit Hilfe des RIP-Programms (25) wurde an die aufge-

zeichnete Fluoreszenzmessung die Summe von zwei Exponentialfunktionen angepaßt (Abb. 6; Anhang). Der erste Term der Anpassung ist ein Maß für die spezifische Bindung, die sehr schnell abläuft und für uns von primärem Interesse ist. Der zweite Term beschreibt unspezifische Prozesse und trägt weniger als 10% zur Meßkurve bei.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation des DS-HSA-Komplexes werden die gemessenen Relaxationskonstanten (Tab. 3 und 4; Anhang) in Abhängigkeit von der Gleichgewichtskonzentration $c_{\overline{HSA}}+c_{\overline{DS}}$ (Abb.2; Ergebnisteil) aufgetragen. Diese Abhängigkeit ist nicht linear. Mit Erhöhung der eingesetzten HSA-Konzentrationen nähert sich die Relaxationskonstante einem Maximalwert, was für das Vorliegen von zwei gekoppelten Gleichgewichten spricht. Es wird dementsprechend im Verlauf der DS-HSA-Bindung ein Anlagerungskomplex durchlaufen, wobei der Ordinatenabschnitt die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des stabilen DS-HSA-Komplexes (k_{-2}) angibt. Der Maximalwert der Relaxationskonstanten (k_{obs}) minus (k_{-2}) liefert die Geschwindigkeitskonstante k_2 für die Umwandlung des Anlagerungskomplexes DS-HSA' in den

stabilen DS-HSA-Komplex. Um diese Konstanten genauer zu bestimmen, wurde eine reziproke Auftragung von $k_{obs} - k_{-2}$ gegen die reziproke Summe der DS und HSA Gleichgewichtskonzentration vorgenommen (Abb. 3; Ergebnisteil). Entsprechend der Gleichung I können graphisch $1/k_2$ als Ordinatenabschnitt und $1/k_2 \cdot K'_A$ als Geradensteigung für die Bindung von DS mit HSA bei einer bestimmten Temperatur ermittelt werden. Die Temperatur lag bei der Durchführung unserer Versuche bei 25°C. Zur Kontrolle der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-2} wurde bei den Patientenseren 1-10 eine Verdrängung des mit HSA komplexierten DS durch Etacrynsäure (E) vorgenommen. Durch den 50-fachen Überschuß von E wird jedes abdissoziierende DS-Molekül sofort durch ein E-Molekül ersetzt. Die für die gemessene Fluoreszenzabnahme berechnete Relaxationskonstante entspricht dann k_{-2}.

3. ERGEBNISSE

3.1. KOMPLEXIERUNG VON DS UND HSA BEI GESUNDEN VERSUCHSPERSONEN

Die Auswertung der aufgezeichneten Fluoreszenz führte zu den Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_2) und der Dissoziation (k_{-2}) sowie zu den Affinitätskonstanten des Anlagerungskomplexes (K_A') und des stabilen Endkomplexes (K_A). Die in Tab. 1 und Tab. 2 für die 10 nierengesunden Probanden angegebenen Medianwerte zeigen bei vergleichbaren Fettsäurekonzentrationen das Bindungsverhalten bei der Komplexierung von DS und HSA.

Konstanten		Patienten	Nierengesunde
$K_A' \cdot 10^4$	M^{-1}	2,24	4,31
k_2	s^{-1}	87,22	206,3
k_{-2}	s^{-1}	27	15
$k_2 \cdot K_A' \cdot 10^6$	$M^{-1}s^{-1}$	1,96	8,89
$K_A \cdot 10^5$	M^{-1}	0,724	5,93

Tab. 1: Die mit Hilfe der Medianwerte der Relaxationskonstanten errechneten kinetischen Konstanten für die Patientengruppe 1 (n=10) und für die nierengesunden Probanden (n=10).

Halbwertszeit	Patienten	Nierengesunde
$t_{1/2}^{ms}$	7,9	3,4
$t_{1/2}^{ms}$	25,7	46,2

Tab. 2: Assoziations- und Dissoziationshalbwertszeiten, berechnet mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstanten k_2 und k_{-2} (nach Tab. 1).

3.2. KOMPLEXIERUNG VON DS UND HSA BEI TERMINALER NIERENINSUFFIZIENZ

Die Einzelwerte der errechneten Relaxationskonstanten sind in den Tab. 3 und 4 im Anhang zu finden. Die Abb. 2 gibt die Abhängigkeit der Relaxationskonstanten (hier Median) von den eingesetzten Konzentrationen des freien HSA und des freien DS für die Urämiepatienten und die Nierengesunden wieder. Die Kurve der Patienten nimmt einen flacheren Verlauf, dessen Endhöhe k_2+k_{-2} entspricht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Probanden wiesen die Ergebnisse der Patienten keine Normalverteilung und eine zweimal größere Streuung auf. Die Berechnung der kinetischen Konstanten der Komplexierung

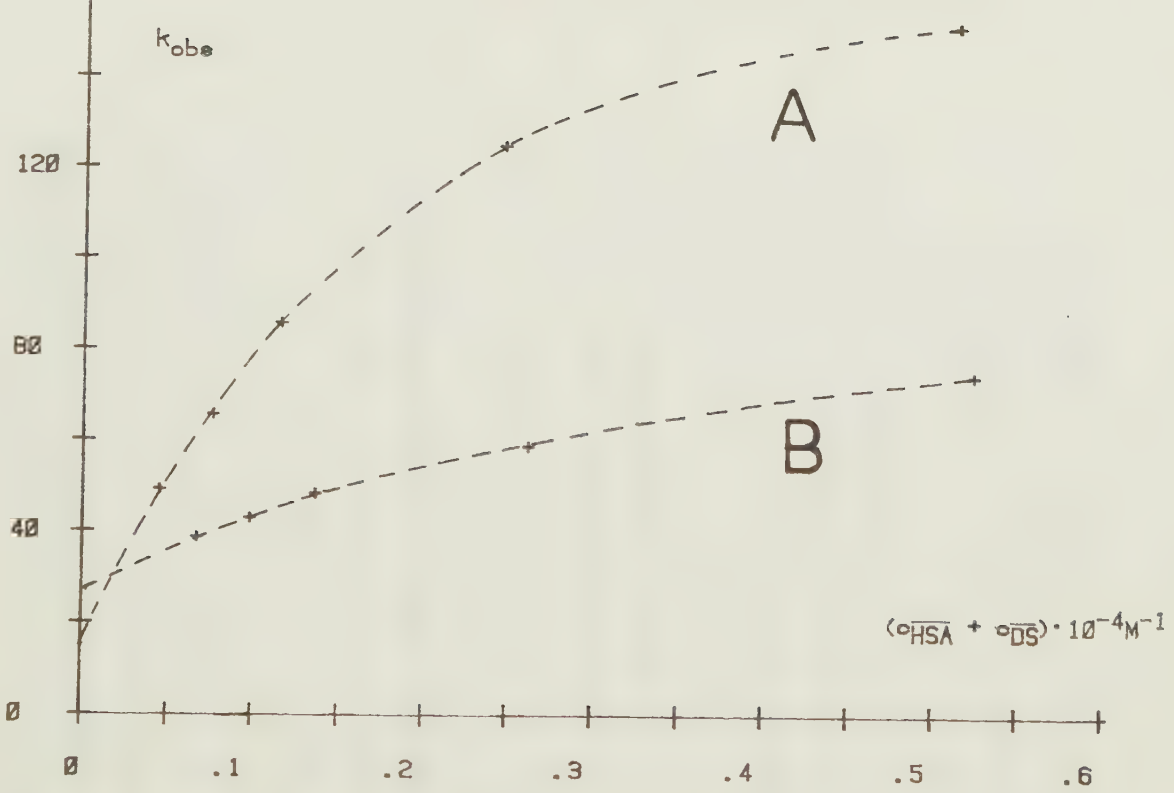

Abb.2: Medianwerte der Relaxationskonstanten der Patientengruppe 1 (A) und Medianwerte der Relaxationskonstanten der nierengesunden Probanden (B) für steigende $(c_{\overline{HSA}} + c_{\overline{DS}}) \cdot 10^{-4} M^{-1}$ Konzentrationen.

von DS und HSA, errechnet aus den Relaxationskonstanten, sind für jeden einzelnen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in Tab. 9 und Tab. 10 im Anhang dargestellt. Die Affinität des Anlagerungskomplexes war im Serum der Patienten erniedrigt ($K'_A=2,24 \cdot 10^4 M^{-1}$; errechnet mit den Medianwerten der Relaxationskonstanten aus den Tab. 3 und 4 (Anhang)). Die Einzelwerte für K'_A bewegten sich zwischen 1,1 und $4,51 \cdot 10^4 M^{-1}$. Unterschiedlich waren auch die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation des DS-HSA-Komplexes. Die Assoziation ($k_2=87,22 s^{-1}$) erfolgte bei den Patienten langsamer ($\overrightarrow{t_{1/2}}=ln_2/k_2=7,9ms$) als im Serum der Gesunden ($\overrightarrow{t_{1/2}}=3,4ms$). Die Einzelwerte für k_2 lagen zwischen 43,5 und $113,26 s^{-1}$. Die Dissoziationshalbwertzeit dieses Komplexes im Patientenserum war geringer ($\overleftarrow{t_{1/2}}=25,7ms$) und erfolgte damit schneller als im Serum der nierengesunden Probanden ($\overleftarrow{t_{1/2}}=46,2ms$). Die Einzelwerte für k_{-2} lagen zwischen 20 und $34 s^{-1}$. Dies spricht für eine Abnahme der Stabilität des DS-HSA-Komplexes bei den Hämodialysepatienten. Zur Kontrolle der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten wurde DS durch Etacrynsäure vom Albuminmolekül verdrängt (siehe auch Kapitel 2.6.2.). Die k_2-Werte aus Bindungs- und Verdrängungs-

messungen wichen bei den Patienten 1,2 und 4 stärker voneinander ab (Tab. 9). Bei diesen Seren war eine Trübung zu beobachten.

Abb. 3 verdeutlicht den gefundenen Unterschied der Kinetik der Komplexierung von DS und HSA in Abhängigkeit von der freien Konzentration für DS und HSA zwischen den Nierengesunden und den Urämikern. Da im Serum des Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz die Bildung des Anlagerungskomplexes vermindert ist und die Umlagerung in den Endkomplex langsamer und dessen Dissoziation schneller erfolgt, resultiert eine verminderte Affinität ($K_A=K'_A \cdot k_2/k_{-2}=0,724 \cdot 10^5 M^{-1}$) von DS und HSA im Vergleich zu den Seren der nierengesunden Probanden ($K_A=5,93 \cdot 10^5 M^{-1}$). Die Einzelwerte für K_A lagen bei den Patienten zwischen 0,53 und $2,3 \cdot 10^5 M^{-1}$.

3.3. KORRELATION ZWISCHEN BINDUNGSKONSTANTEN UND LABORPARAMETERN BEI PATIENTEN MIT TERMINALER NIERENINSUFFIZIENZ

Die genannten Veränderungen der Bindungskinetik von DS und HSA bei den Patienten mit terminaler Nieren-

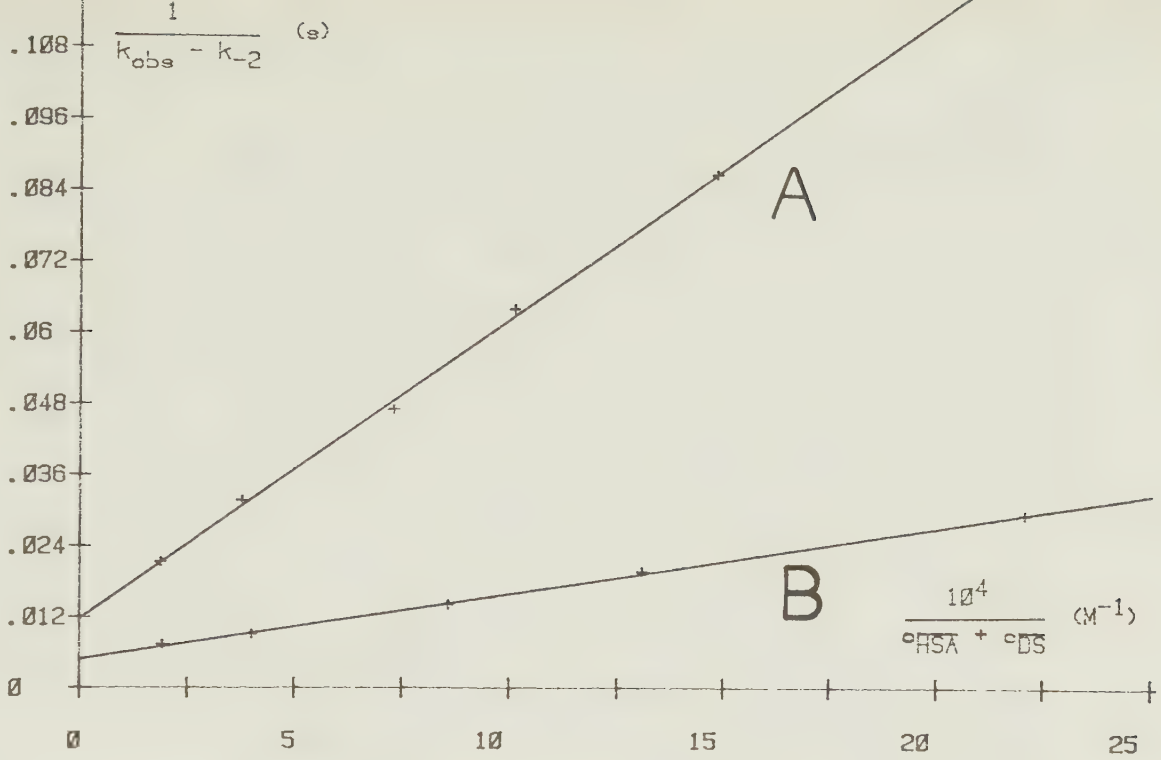

Abb.3: Bindungskonstanten für Seren von terminal niereninsuffizienten Patienten (A) und für Seren nierengesunder Probanden (B).

insuffizienz wurden mit den Ergebnissen aus den Laboruntersuchungen korreliert. Es wurde jeweils die lineare Korrelation zwischen einer der errechneten Konstanten (K_A, K'_A, k_2, k_{-2}) und der VLDL-,HDL-Fraktion der Lipidelektrophorese, der Konzentration der Triglyceride, der freien Fettsäuren und des Bilirubins, sowie für die vergangene Zeitspanne nach der letzten Dialyse geprüft. Die Berechnung, ob ein Ergebnis es erlaubt, von Signifikanz zu sprechen, erfolgte durch Bestimmung des 95%igen Vertrauensbereiches für den errechneten Korrelationskoeffizienten. Es ergab sich für die Prüfung der genannten Abhängigkeiten keine signifikante Korrelation. Allerdings fanden wir eine signifikante Korrelation zwischen der Affinitätskonstanten des Anlagerungskomplexes (K'_A) und der LDL-Fraktion (Abb. 4). Hierbei ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r=0,537$, dessen 95%iger Vertrauensbereich von $0,01 \leq r \leq 0,83$ geht. Da der angegebene Bereich die "Null" nicht miteinschließt, ist die Korrelation auf dem 5% Niveau signifikant.

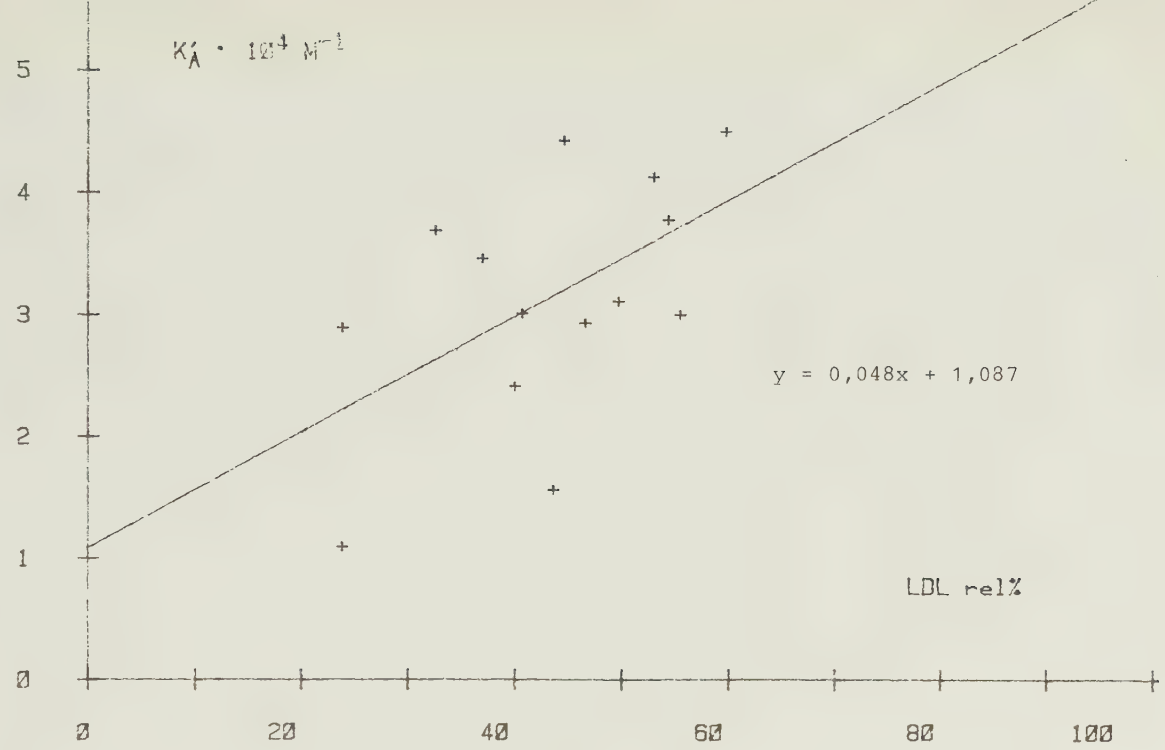

Abb.4: Affinitätskonstante des Anlagerungskomplexes (K_A') für Patientenseren in Abhängigkeit von den rel% der LDL-Fraktion (r=0,539; 95%iger Vertrauensbereich $0,01 \leq r \leq 0,83$).

4. DISKUSSION

4.1. VERÄNDERTE BINDUNG VON DS UND HSA BEI TERMINALER NIERENINSUFFIZIENZ

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich die Kinetik der Bindung von DS an HSA zwischen den nierengesunden Probandenseren und den Seren der Patientengruppe 1 (Patienten 1-10) deutlich unterscheidet (Abb. 2 und 3; Ergebnisteil). Die Affinitätskonstante des Anlagerungskomplexes, welcher innerhalb von 3ms nach Zusammenbringen von Serum und DS bereits im Gleichgewicht vorliegt, ist für die Patientengruppe 1 deutlich kleiner ($K_A'=2,24\cdot10^4M^{-1}$) als für die Probandenseren ($K_A'=4,3\cdot10^4M^{-1}$). Dies kann für eine kompetitive Besetzung von Bindungsplätzen des HSA mit endogenen Substanzen sprechen. Die verminderte Affinitätskonstante des Endkomplexes der Patienten ($K_A=0,724\cdot10^5M^{-1}$) im Vergleich zu den Probanden ($K_A=5,93\cdot10^5M^{-1}$) sowie die verminderte Affinitätskonstante des Anlagerungskomplexes (K_A') verdeutlichen, daß es in den Seren der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu einer Abnahme der Bindungsstellen für DS auf dem Albuminmolekül kommt. Bianchi postulierte

eine Verminderung der für die Bindung mit Pharmaka zur Verfügung stehenden Bindungsstellen am HSA durch eine alleinige Verminderung des HSA (7). Der Albumingehalt bei den von uns untersuchten Patientenseren war niedrig (4,1±0,2;3,7-4,5g/dl). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit zahlreichen Autoren (7,8,60). Nach den vorliegenden Ergebnissen (Tab. 1 und 2; Ergebnisteil) ist es aber ausgeschlossen, daß der von uns beobachtete Bindungsablauf der verminderten Komplexierung von DS und HSA beim Urämiker ausschließlich auf eine erniedrigte HSA-Konzentration zurückzuführen ist.

Im Patientenserum war die Halbwertzeit der Umlagerung in den stabilen DS-HSA-Komplex, $t_{1/2}^{\rightarrow}$=7,9ms und dessen Dissoziationshalbwertszeit, $t_{1/2}^{\leftarrow}$=25,7ms unterschiedlich zu den mit Probandenseren von Nierengesunden ermittelten kinetischen Parametern: $t_{1/2}^{\rightarrow}$=3ms, $t_{1/2}^{\leftarrow}$=46ms. Wie Boobis annahm, kann diese Abnahme beispielsweise durch eine Veränderung der Primärstruktur des HSA-Moleküls auftreten. So könnte eine polare- durch eine apolare Aminosäure (AS) ersetzt werden. Eine sich anschließende Änderung der Raumstruktur des Moleküls würde dafür sprechen, daß die Veränderungen bei der Bildung des Albumins entstand, und der Austausch der AS

zu einer Sequenzänderung führte (8). Saito und Mitarb. postulierten eine Entspiralisierung der Helices des Albumins, welche durch eine Änderung der AS-Sequenz zustande kommt (54). Es kann aber auch ohne Änderung der AS-Sequenz zu einer Entspiralisierung der Helix kommen (z.B. durch eine pH-Verschiebung). Im einfachsten Falle könnte eine allosterische Änderung des HSA nur durch eine Verschiebung der Helix ausgelöst sein. Damit könnte sich die Bindungsstelle ändern und das Substrat (hier DS) nicht mehr passen. Da im Serum des Urämikers die Bildung des Anlagerungskomplexes reduziert war, die Umlagerung in den Endkomplex langsamer und dessen Dissoziation schneller erfolgte, resultierte eine verminderte Komplexierung von DS und HSA im Vergleich zu den Nierengesunden. Die beschriebenen Veränderungen legen nahe, daß endogene Substanzen im Serum der Urämiepatienten vorliegen, die allosterische Wechselwirkungen mit DS am HSA und/oder Konformationsänderungen des HSA hervorrufen.

4.2. TRIGLYCERIDE, CHOLESTERIN UND CHOLESTERINESTER BEI TERMINALER NIERENINSUFFIZIENZ

Bei unseren Untersuchungen fanden wir signifikant erhöhte Triglyceridspiegel in den Seren der Patienten (321,2±219,1;150(200)mg/dl). Auch andere Autoren nannten diese Veränderung (39,58). Schmicker und Mitarb. fanden außerdem, daß die Dialyse selbst die Triglyceridkonzentration beeinflußt. Die Werte von dialysierten Patienten lagen eindeutig höher als die von nicht dialysierten urämischen Patienten. Als Ursache wird eine Erniedrigung der Lipoproteinlipaseaktivität angenommen. Dies könnte durch einen nicht dialysablen Inhibitor und/oder durch die chronische Heparinisierung bedingt sein (58). Die Arbeitsgruppen um Schmicker und Schäfer fanden keine Erniedrigung der Triglyceridspiegel mit zunehmender Dauer der chronischen Dialysebehandlung über mehrere Jahre hinweg (55,58). Während der Dialyse allerdings kam es im Mittel zu einem Abfall der Triglyceride, welcher 15 Minuten nach Dialysebeginn einsetzte. Nach einer Stunde stiegen die Werte wieder langsam an, erreichten aber nach 30 Minuten nach Dialyseende immer noch nicht den Ausgangswert (58). Neben der erniedrigten Lipoproteinlipase-

aktivität spielt für die Hypertriglyceridämie die Erhöhung des Insulinspiegels im Serum durch chronische Stimulierung eine wesentliche Rolle (26). Als Ursache der Insulinstimulierung nimmt man eine Glucosestoffwechselstörung und einen Insulinantagonismus durch Stoffwechselmetabolite des Urämikers an (55).

Die Cholesterinkonzentrationen der Patientenseren bewegten sich im angegebenen Referenzbereich für Nierengesunde (245±53,5;220(260)mg/dl). Dies ist in Übereinstimmung mit Patsch und Mitarb. (50). Wiklund und Gustafson fanden hingegen eine signifikante Erhöhung der Cholesterinkonzentration in den Seren von Urämikern (69). Nach Schmicker und Mitarb. hat die Dialyse keinen Einfluß auf die Konzentration des Cholesterins (58). Es erfolgte keine Auftrennung in freies und verestertes Cholesterin.

Die von der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase katalysierte Reaktion, d.h. die Überführung von Cholesterin und Lecithin in Cholesterinester und Lysolecithin, dient der relativen Konstanthaltung zwischen freiem und verestertem Cholesterin. Durch

die LCAT wird die Veresterung von Cholesterin mit ungesättigten Fettsäuren, die aus der Position 2 des Lecithins stammen (2-Acyl-Gruppe), vorgenommen. Bei unseren Untersuchungen fanden wir signifikant erniedrigte Cholesterinkonzentrationen der Urämiker (bis zu 29% erniedrigt). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Guarnieri und Mitarb., welche bei urämischen Patienten verminderte Serumkonzentrationen der Cholesterinester und des Lysolecithins sowie eine verminderte LCAT-Aktivität feststellten. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz war die LCAT-Aktivität sowohl im Patientenserum selbst als auch nach dem Versetzen dieses Serums mit thermisch desaktiviertem Serum von Gesunden als Substrat erniedrigt. Sie folgerten aus ihren Ergebnissen, daß die LCAT-Aktivitätslimitierung nicht durch Inhibitoren, sondern wahrscheinlich ausschließlich durch eine verminderte Produktion des Enzyms in der Leber bedingt sei (22). Jedoch kann es für die volle Entfaltung der LCAT-Aktivität erforderlich sein, daß Reaktionsprodukte sofort gebunden werden (Aufnahme des Cholesterinesters durch Lipoproteine, Bindung des Lysolecithins an HSA). Insbesondere die von Cohen und Mitarb. aufge-

zeigte Korrelation der LCAT-Aktivität mit der Albuminkonzentration im Patientenserum spricht für eine Abhängigkeit der LCAT-Aktivität von der Fähigkeit des HSA zur Komplexierung des Lysolecithins (12). Sie scheint im Serum von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz im Vergleich zum Serum von Gesunden erniedrigt zu sein, wie vorläufige Untersuchungen mit Dansylsarcosin ergaben (DS wird durch Lysolecithin aus der Bindungsstelle am HSA verdrängt) (33). Die für die Bindung mit DS zur Verfügung stehenden Bindungsstellen auf dem Albuminmolekül, erfaßt durch die Affinitätskonstante des Anlagerungskomplexes (K'_A), nehmen mit Zunahme der Cholesterinkonzentration ab. Es ergab sich aber keine signifikante Korrelation. Sinnvoll wäre es, eine direkte Bestimmung der LCAT-Aktivität bei den Urämikern vorzunehmen und das Ergebnis mit der Affnitätskonstanten zu korrelieren. Dies würde einen Einfluß der Enzymaktivität auf die von uns untersuchte Bindungsstelle beweisen bzw. widerlegen. Mehrere Autoren berichten von einer Beeinflussung der LCAT-Aktivität durch die Triglyceride (45,50,66). Dagegen ergab sich kein Einfluß aus den Untersuchungen von Walter, welcher Seren diabetischer Patienten untersuchte.

Eine signifikant positive Korrelation fand sich in seiner Studie zwischen der LDL-Fraktion und der LCAT-Aktivität (67).

4.3. DIE LIPIDELEKTROPHORESE UND FREIE FETTSÄUREN BEI TERMINALER NIERENINSUFFIZIENZ

Die von uns beobachteten Veränderungen der Lipidelektrophorese bei treminaler Niereninsuffizienz sind in Übereinstimmung mit Autoren, welche ihre Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Patientenseren vornahmen (22,43,44).

Die HDL-Fraktion lag bei den Urämiepatienten an der unteren Grenze des angegebenen Referenzbereis (27,2±10,5;26-61rel%). Den Lipoproteinen mit hoher Dichte (HDL) kommt bei der Veresterung des Cholesterins eine entscheidende Rolle zu. Sie enthalten an ihrer Oberfläche die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT). HDL transportiert, im Gegensatz zu LDL, Cholesterin vorwiegend vom extrahepatischen Gewebe zur Leber. Die anteilsmäßige Verminderung der HDL-Fraktion ist im Zusammenhang mit der LCAT-Aktivität zu sehen (22). Wie Chan und Mitarb. feststellten, tritt eine Ver-

änderung in der Zusammensetzung der HDL-Fraktion bei urämischen Patienten auf, bei welchen die Cholesterinkonzentration der HDL vermindert ist (10).

Wir fanden keine Beeinflussung der Gesamt-LDL-Fraktion durch die terminale Niereninsuffizienz (43,2±11,1; 26-66rel%). Wie Guarnieri und Mitarb. feststellten, tritt allerdings eine Verminderung der LDL_2 auf, bei gleichzeitiger Zunahme der LDL_1. Auch nimmt der Triglyceridgehalt der LDL-Fraktion zu (22). In diesem Zusammenhang scheinen Untersuchungen von Hovig und Mitarb. interessant, welche bei Patienten mit hepatorenalem Syndrom große Partikel fanden, die der LDL-Fraktion angehörten. Sie nahmen weiterhin eine elektronenmikroskopische Untersuchung von osmophilem Material vor, welches sich in den Glomeruli der Patientennieren abgelagert hatte (hauptsächlich subendothelial entnommen), und stellten die Ergebnisse dem untersuchten Material von Gesunden gegenüber. Dabei fanden sie Substanzen, die bei Gesunden nicht gefunden werden konnten. Diese waren wahrscheinlich aus Phospholipid und Cholesterin zusammengesetzt. Bemerkenswert ist, daß diese beobachteten Veränderungen der entnommenen Materialien nicht nur bei Patienten mit

hepatorenalem Syndrom, sondern auch bei Patienten mit familiärem LCAT-Mangel auftraten. Die Autoren nehmen deshalb an, daß die pathogenetischen Mechanismen möglicherweise dieselben sind, und die LDL_2-Partikel mit hohem Molekulargewicht pathogenetisch wichtig sind für die Lipidablagerung und für das Krankheitsbild als solches (14). Aus unseren Ergebnissen ergab sich bei der Auftragung der LDL-Fraktion gegen K'_A (Abb.4; Ergebnisteil) eine signifikant positive Korrelation. Walter nahm eine Untersuchung von Seren diabetischer Patienten vor und erhielt einen signifikant positiven Korrelationskoeffizienten zwischen der LDL-Fraktion und der LCAT-Aktivität (66). Dies alles spricht dafür, daß sowohl die LDL-Fraktion, wahrscheinlich die LDL_2-Unterfraktion, als auch die verminderte LCAT-Aktivität mitverantwortlich sind für die Abnahme der Affinitätskonstante in den Seren der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz.

Die VLDL-Fraktion war bei allen untersuchten Hämodialysepatienten erhöht (29,6±15,4;4-12rel%). Es trat somit eine deutliche Beeinflussung des VLDL-Katabolismus bei diesen Patienten auf. Chan und Mitarb. erklären sie sich dadurch, daß die VLDL-Sekretionsrate einerseits zunimmt, und die VLDL-Clearance andererseits

abnimmt. Parallel zur initialen kompensatorischen Erhöhung der hepatischen Albuminsynthese kommt es zu einer vermehrten VLDL-Sekretionsrate. Die verminderte VLDL-Clearance ist dabei wahrscheinlich auf eine verminderte Aktivität der Lipoproteinlipase zurückzuführen,die das VLDL spaltet. Eine Zunahme des Triglyceridgehaltes der VLDL-Fraktion tritt beim Urämiker auf (10).

Bei den untersuchten urämischen Patientenseren lagen die Konzentrationen für die freien Fettsäuren (FFA) im unteren angegebenen Referenzbereich (0,33±0,12; 0,19-0,9mmol/l) und damit niedriger als bei Nierengesunden. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Schmicker und Mitarb. (58). Sie fanden in dieser Studie weiterhin, daß es zu Beginn der Dialyse zu einem enormen Anstieg der FFA kam, während sich zu Dialyseende ein kontinuierlicher Abfall der FFA zeigte. Der Anstieg der FFA wie auch der Abfall der Triglyceride wurde durch die initiale Heparininjektion von 10000E verursacht, die zu einer Aktivierung der Lipoproteinlipase führte (39). Für unsere Untersuchungen war ein Einfluß des Heparins auszuschließen, da zwischen der Blutabnahme und der letzten Dialyse

mindestens 29,5 Stunden vergangen waren, und die Halbwertszeit der Aktivität von Heparin gering ist. Sie ist dosisabhängig und beträgt beispielsweise für einen 70kg schweren Menschen nach 7000, 14000 bzw.28000USP E rund 60, 100 bzw. 150 Minuten (20). Die FFA sind in der Lage, in höheren Konzentrationen Einfluß auf die von uns untersuchte Bindungsstelle zu nehmen (24). Diese Erkenntnis war für unsere Untersuchungen nicht relevant, da die FFA-Konzentrationen nicht erhöht waren.

Eine signifikante Abhängigkeit zwischen den ermittelten Konstanten (Tab. 1; Ergebnisteil) und der Ätiologie der Erkrankung konnte nicht gefunden werden. Dies ist auch verständlich, da selbst der Pathologe nach länger bestehender terminaler Niereninsuffizienz nur noch den kollagenen Umbau des Nierenparenchyms feststellen und selten eine sichere Aussage über die Ätiologie treffen kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der stopped-flow Fluoreszenzmessungen konnte gezeigt werden, daß die Komplexierung von DS und HSA bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz verändert ist, verglichen mit den Seren nierengesunder Probanden. Die Affinitätskonstante des Anlagerungskomplexes (DS-HSA'), welcher innerhalb von 3ms nach Zusammenbringen von Serum und DS bereits im Gleichgewicht vorliegt, ist für die Patientenseren deutlich kleiner ($K_A'=2,24\cdot10^4M^{-1}$) als für die Seren nierengesunder Probanden ($K_A'=4,31\cdot10^4M^{-1}$). Im Patientenserum ist die Halbwertszeit der Umlagerung in den Endkomplex DS-HSA, $\overrightarrow{t_{1/2}}=7,9$ms und dessen Dissoziationshalbwertszeit, $\overleftarrow{t_{1/2}}=25,7$ms ($K_A=K_A'\cdot\frac{\overrightarrow{t_{1/2}}}{\overleftarrow{t_{1/2}}}=0,724\cdot10^5M^{-1}$) unterschiedlich zu den mit Seren der Probanden ermittelten kinetischen Parametern: $\overrightarrow{t_{1/2}}=3,4$ms, $\overleftarrow{t_{1/2}}=46,2$ms, ($K_A=5,9\cdot10^5M^{-1}$). Da im Serum des Urämikers die Bildung des Anlagerungskomplexes reduziert war, die Umwandlung in den Endkomplex langsamer und dessen Dissoziation schneller erfolgte, resultierte eine verminderte Komplexierung von DS und HSA im Vergleich zu den Nierengesunden.

Die beschriebenen Veränderungen legen nahe, daß endogene Substanzen im Serum der Urämiepatienten vorliegen, die allosterische Wechselwirkungen mit DS am HSA und/oder Konformationsänderungen des HSA hervorrufen.

Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Affinitätskonstanten des Anlagerungskomplexes (K'_A) und der LDL-Fraktion der Lipidelektrophorese. Dieser Fraktion kommt möglicherweise ein Einfluß bei der Verminderung der für die Bindung von DS am HSA zur Verfügung stehenden Bindungsstellen am Albuminmolekül zu.

L I T E R A T U R

(1) Andreasen,F.
Protein Binding of Drugs in Plasma from Patients with acute Renal Failure,
Acta Pharmacol Toxicol, 32 (1973) 417-429

(2) Ashbrook,J.D.,A.A.Spector,J.E.Fletcher
Medium Chain Fatty Acid Binding to Human Plasma Albumin,
J Biol Chem, 247:21 (1972) 7038-7042

(3) Attman,P.-O.,A.Gustafson
Lipid and carbohydrate metabolism in uremia,
Eur J Clin Invest, 9 (1979) 285-291

(4) Bachmann,K.,R.Shapiro
Protein Binding of Coumarin Anticoagulants in Disease States,
Clin Pharmacokinet, 2 (1977) 110-126

(5) Bachmann,K.,M.Valentovic,R.Shapiro
A possible role for cyanate in the albumin binding defect of uremia,
Biochem Pharmacol, Vol.29 (1980) 1598-1601

(6) Bernasconi,C.F.
Relaxation kinetics,
Academic Press, New York, USA, (1976)

(7) Bianchi,R.,G.Mariani,M.G.Toni et al.
The metabolism of human serum albumin in renal failure on conservative and dialysis therapie,
Am J clin Nutr, 31:9 (1978) 1615-1626

(8) Boobis,S.W.
Alteration of Plasma Albumin in Relation to Decreased Drug Binding in Uremia,
Clin Pharmacol Ther, 22(2)(1977) 147-153

(9) Brass,H.
Chronische Niereninsuffizienz,
Deutsches Ärzteblatt, 40 (1982) 21-26

(10) Chan,M.K.,Z.Varghese,J.F.Moorhead (Editorial Review)
Lipid abnormalities in uremia, dialysis and transplantation,
Kidney Int, Vol.19 (1981) 625-637

(11) Chen,R.F.
Fluorescence Stopped-Flow Study of Relaxation Processes in the Binding of Bilirubin to Serum Albumins,
Arch Biochem Biophys, 184:1 (1977) 282-289

(12) Cohen,S.L.
The mechanism of hyperlipidaemia in nephrotic syndrom - role of low albumin and LCAT reaction,
Clin Chim Acta, 104 (1980) 393-400

(13) Craig,W.A.,M.A.Evenson,V.Ramgopa
The Effect of Uremia, Cardiopulmonary Bypass and Bacterial Infection on Serum Protein Binding, in: Benet,L.Z.,The Effect of Disease States on Drug Pharmacokinetics, American Pharmaceutical Association Academy of Pharmaceutical Sciences (1976) 125-136

(14) Craig,W.A.,B.Suh
Changes in Protein Binding During Disease, Scand J Infect Dis (Suppl), 14 (1978) 239-244

(15) Dromgoole,S.H.
The Effect of hemodialysis on the binding capacity of albumin, Clin Chim Acta, 46 (1973) 469-472

(16) Dromgoole,S.H.
The binding capacity of albumin and renal disease, J Pharmacol Exp Ther, 191 (1974) 318-323

(17) Erich,E.,M.Eggstein
Die Bindungsfähigkeit des Serum-Albumins für Bromsulphthalein bei Patienten mit chronicher Urämie während Hämodialyse-Behandlung, Klin Wschr, 50 (1972) 658-660

(18) Europäische Dialyse- und Transplantationsgesellschaft (EDTA):
Combined report on regular Dialysis and Transplantation in Europe, (1979),
in: Deutsches Ärzteblatt, 40 (1982) 21-26

(19) Felts,J.M.,B.Zacherle,G.Childress
Lipoprotein Spectrum Analysis of Uremic Patients Maintained on Chronic Hemodialysis,
Clin Chim Acta, 93:1 (1979) 127-134

(20) Forth,W.,D.Henschler,W.Rummel
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie,
Wissenschaftsverlag (1977)

(21) Fredrickson,D.S.,R.S.Lees
A system for phenotyping hyperlipoproteinemia,
Circulation, 31 (1965) 321

(22) Guarnieri,G.F.,M.Maracchiello,L.Campanacci et al.
Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) activity in chronic uremia,
Kidney Int, 13:Suppl8 (1978) S-26-S-30

(23) Gugler,R.
Arzneimittelwechselwirkungen in der Therapie mit Cumarin-Derivaten,
Internist, 20 (1979) 238-244

(24) Gugler,R.,D.W.Shoeman,D.L.Azarnoff
Effects of in vivo elevation of free fatty acids on prtein binding of drugs,
Pharmacology, 12 (1974) 160-165

(25) von Hattingberg,H.M.,D.Brockmeier,G.Kreuter
A rotating iterative procedure (RIP) for estimating hybrid constants in multi-compartment analysis on desk computers,
Europ J Clin Pharmacol, 11 (1977) 381-388

(26) Hörl,W.H.,M.Hörl,A.Heidland
Fettstoffwechselstörungen bei Nierenkrankheiten - Pathogenetische Mechanismen,
Klin Wochenschr, 60 (1982) 327-336

(27) Hovig,G.,J.P.Blomhoff,R.Holme et al.
Plasma Lipoprotein Alterations and Morphologic Changes with Lipid Deposition in the Kidneys of Patients With Hepatorenal Syndrome,
Lab Invest, 38:5 (1978) 540-549

(28) Huttunen,J.K.,A.Pasternack,T.Vänttinen et al.
Lipoprotein Metabolism in Patients with Chronic Uremia,
Acta Med Scand, 204(3) (1978) 211-218

(29) Jusko,W.J.
Pharmacokinetics in Disease States Changing Protein Binding,
in: Benet,L.Z.,The Efeect of Disease States on Drug Pharmacokinetics,
American Pharmaceutical Association Academy of Pharmaceutical Sciences (1976) 99-124

(30) Kober,A.,I.Sjöholm,O.Borga,I.Odar-Cederlöf
Protein Binding of Diazepam and Digitoxin in Uremic and Normal Serum,
Biochem Pharmacol, Vol.25 (1979) 1037-1042

(31) Koslik,S.,M.Takac,G.Koslikova
Einfluß von Hämodialyse, Heparin und Protamin auf die Prä-ß-Fraktion der Lipoproteine bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz,
Z Gesamte Inn Med, 32:23 (1977) 658-661

(32) Kragh-Hansen,U.
Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin,
Pharmacological Reviews, 33:1 (1981) 17-53

(33) Laßmann,A.,W.Kratzer
(unveröffentlichte Ergebnisse)

(34) Kriegelstein,J.
Bestimmungsmethoden, physikochemische Grundlagen und pharmakokonetische Bedeutung der Plasma-proteinbindung von Arzneimitteln,
Drug Res, 23:11 (1973) 1527-1529

(35) Krumlovsky,F.A.
Disorders of Protein Binding and Lipid Metabolism Associated with Chronic Renal Failure and Chronis Dialysis,
Annals of clin. Lab. Science, 11:4 (1981) 350-360

(36) Laßmann,A.,W.Kratzer,N.Rietbrock
Stopped-Flow Studies on Drug Protein Binding,
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.,
320 (1982) 189-195

(37) Levy,G.
Clinical Implications of interindividual Differences in Plasma Protein Binding of Drugs and endogenous Substances,
in: Benet,L.Z.,The Effect of Disease States on Drug Pharmacokinetics,
American Pharmaceutical Association Academy of Pharmaceutical Sciences (1976) 137-154

(38) Losowsky,M.S.,D.H.Kenward
Lipid metabolism in acute and chronic renal failure,
J Lab Clin Med, 71 (1968) 736-743

(39) Mc Cosh,E.J.,K.Solangi,J.M.Rivers et al.
Hypertriglyceridemia in patients with chronic renal insufficiency,
Am J Clin Nutr, 28 (1975) 1036

(40) Minamisono,T.,M.Wada,A.Akamatsu et al.
Dyslipoproteinemia (a Remnant Lipoprotein Disease) in Uremic Patients on Hemodialysis,
Clin Chim Acta, 84(1-2) (1978) 163-172

(41) Nestel,P.J.,N.H.Fidge,M.H.Tan
Increased Lipoprotein-Remnant Formation in Chronic Renal Failure,
N Engl J Med, 307:6 (1982) 329-333

(42) Nittinger,H.C.,P.Brühl
Nierenfunktion im Alter,
Med Klin, 76:12 (1981) 328-334

(43) Norbeck,H.
Serum lipoproteins in chronic renal failure,
Acta Med Scand (Suppl), 649 (1981) 1-49

(44) Norbeck,H.E.,L.A.Carlson
The Uremic Dyslipoproteinemia: Its Characteristics and Relations to Clinical Factors,
Acta Med Scand, 209 (1981) 489-503

(45) Nordby,G.,B.-E.Hustved,K.R.Norum
The hepatic secretion of lecthin:cholesterol acyltransferase in rats with increased secreation of triglycerids due to ventromedial hypothalamic lesions,
Scand J Clin Lab Incest, 39 (1979) 235-240

(46) Norum,K.R.,J.A.Glomset,A.V.Nichols et al.
Plasma Lipoproteins in Familial Lecthin:Cholesterol Acyltransferase Deficiency: Physical and Chemical Studies of Low and High Density Lipoproteins,
J Clin Invest, Vol.50 (1971) 1131-1140

(47) Odar-Cederlöf,I,O.Borga
Lack of Relationship between Serum Free Fatty Acids and Impaired Plasma Protein Binding of Diphenylhydantoin in Chronic Renal Failure,
Europ J Pharmacol, 10 (1976) 403-405

(48) Ohnhaus,E.E.
Arzneimittelwechselwirkungen durch Beeinflussung der Plasmaeiweißbindung,
Internist, 20 (1979) 225-228

(49) Papadopoulos,N.M.,W.Z.Borer,R.J.Elin et al.
An Abnormal Lipoprotein in the Serum of Uremic Patients Maintained on Chronic Hemodialysis,
Ann Intern Med, 92(5) (1980) 634-635

(50) Patsch,W.,H.J.Lisch,S.Sailer et al.
Initial cholestrol esterification rate in hyperlipoproteinaemia: effects of triglyceride rich lipoproteins,
Eur J Clin Invest, 8 (1978) 209-213

(51) Reaven,G.M.,R.S.Swenson,M.L.Sanfellippo
An inquiry into the mechanism of hypertriglyceridemia in patients with chronic renal failure,
Clin Nutr, 33:7 (1980) 1476-1484

(52) Rietbrock,N.,A.Laßmann
Stopped-Flow Studies on Drug-Protein Binding,
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 313 (1980) 269-274

(53) Roth,D.A.,R.C.Meade,J.J.Barboriak
Glucose, Insulin and Free Fatty Acids in Uremia,
Diabetes, 22:2 (1973) 111-114

(54) Saito,A.,Y.Yamamoto,K.Maeda et al.
Abnormal Conformation of Albumin in Uraemia,
Proc Eur Dial Transplant Assoc, 15 (1978) 628-629

(55) Schäfer,B.,V.Heize,R.Kluthe
Lipidstoffwechsel bei fortgeschrittener chronischer Niereninsuffizienz,
Nieren- und Hochdruckkrankheiten, 4 (1974) 163-168

(56) Scheider,W.
Real-Time Measurement of Dielectric Relaxation of Biomelecules: Kinetics of a Protein-Ligand Binding Reaction,
Annals New York Academy Sciences, (1977) 47-56

(57) Scheider,W.
Dissociation Rate of Serum Albumin-Fatty Acid Complex From Stopped-Flow dielectric Study of Ligand Exchange,
Biophys J, 24:1 (1979) 260-262

(58) Schmicker,R.,E.Kröger,J.Dabels et al.
Fettstoffwechselstörungen bei konservativer Therapie und Hämodialysetherapie der chronischen Niereninsuffizienz,
Dt. Gesundh.-Wesen, 32 (1977) 1403-1408

(59) Schwartz,P.A.,C.T.Rhodes,D.S.Greene
Effect of Free Acid Concentration on Furesemide Binding to Human Serum Albumin,
Pharmacology, 22 (1981) 364-370

(60) Shoeman,D.W.,D.L.Azarnoff
The Alteration of Plasma Proteins in Uremia as Reflected in their Ability to Bind Digitoxin and Diphenylhydantoin,
Pharmacol, 7 (1972) 169-177

(61) Sjöholm,I.,A.Kober,I.Odar-Cederlöf et al.
Protein Binding of Drugs in Uremic and Normal Serum: The Role of Endogenous Binding Inhibitors,
Biochem Pharmacol, Vol.25 (1976) 1205-1213

(62) Tillement,J.P.,F.Lhoste,J.F.Giudicelli
Diseasis and Drug Protein Binding,
Clin Pharmacokinet, 3(2) (1978) 144-154

(63) Tillement,J.P.,R.Zini,P.d'Athis et al.
Binding of certain acidic drugs to human serum albumin: Theoretical and practical estimation of fundamental parameters,
Europ J Clin Pharmacol, 7 (1974) 307-313

(64) Trout,D.L.,E.H.Estes,S.J.Friedberg
Titration of free fatty acids in plasma: a study of current methods and new modification,
J Lipid Res, 1 (1960) 199-202

(65) Ulrich,R.
Untersuchung des Bindungsverhaltens von Humanserumalbumin bei nierengesunden Probanden im Rahmen seiner Dissertation,
(unveröffentlichte Ergebnisse)

(66) Wallentin,L.,O.Vikrot
Lecithin:cholesterol acyl transfer in plasma of normal persons in relation to lipid and lipoprotein concentration,
Scand J Clin Lab Invest, 35 (1975) 669-676

(67) Walter,G.
Untersuchungen zur Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (EC 2.3.1.43) Aktivität bei Diabetikern,
Dissertation, Kiel 1981

(68) Welling,P.G.,W.A.Craig
Pharmacokinetics in Disease States Modifying Renal Function,
in: Benet,L.Z., The Effect of Disease States on Drug Pharmacokinetics,
American Pharmaceutical Association Academy of Pharmaceutical Sciences (1976) 155-188

(69) Wiklund,O.,A.Gustafson
Lecithin:cholesterol acyl transfer (LCAT) and fatty acid composition of lecithin and cholesterol esters in young male myocardial infarction survivors
Atherosclerosis, 33 (1979) 1-8

(70) Yacobi,A.,G.Levy
Intraindividual Relationships between Serum Protein Binding of Drugs in Normal Human Subjects, Patients with impaired Renal Funktion and Rats,
J Pharm Sci, 66(9) (1977) 1285-1288

(71) Yao,J.K.,P.J.Palumbo,P.J.Dyck
Lecithin:Cholesterol Acyltransferase and Serum Fatty Acids,
Artery, 9(4) (1981) 262-274

A B K Ü R Z U N G E N

AS = Aminosäure

DS = Dansylsarcosin

E = Etacrynsäure

FFA = freie Fettsäuren

FS = Fettsäuren

GN = chronische Glomerulonephritis

LCAT = Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase

LDL = low density lipoproteins

LP = Lipoprotein

HDL = high density lipoproteins

HSA = Humanserumalbumin

NI = Niereninsuffizienz

Nsk = maligne Nephrosklerose

PN = chronische Pyelonephritis

RIP = rapid iterations programm

TNI = terminale Niereninsuffizienz

$t_{1/2}$ = Halbwertszeit

U = unklare Ätiologie

VA = Vielfachanalyse

VLDL = very low density lipoproteins

Z = Zystenniere

A N H A N G

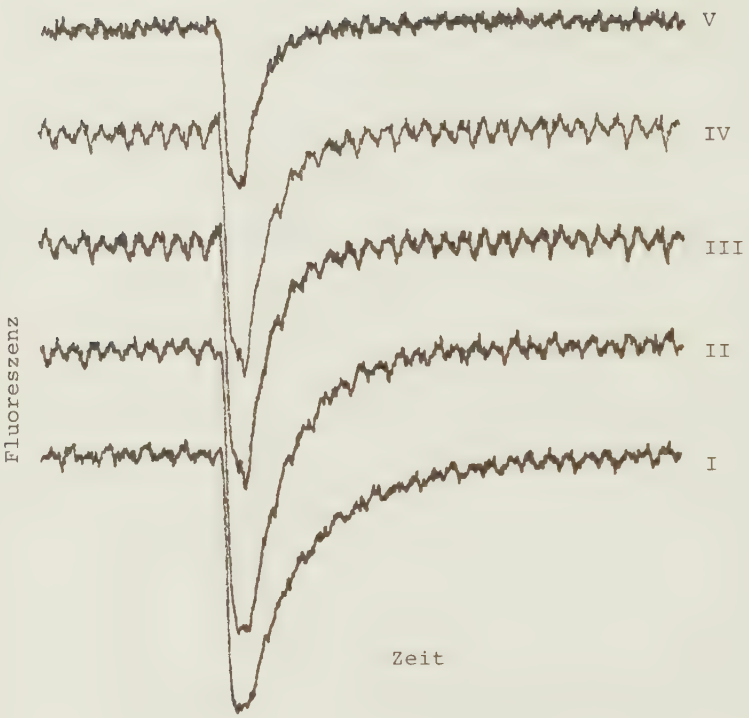

Abb.5: Original Meßkurvenverlauf der stopped-flow Fluoreszenzmessungen bei steigender HSA-Konzentration ($I=0{,}055\cdot10^{-4}M^{-1}$ bis $V=0{,}54\cdot10^{-4}M^{-1}$; in der Mischkammer). Die Konzentration für DS betrug bei jeder Messung $0{,}025\cdot10^{-4}M^{-1}$ in der Mischkammer. Das jeweils links dargestellte Fluoreszenzmaximum wurde vor dem Einbringen neuer Lösungen aufgezeichnet und stammt von einer vorangegangenen Messung unter gleichen Bedingungen.

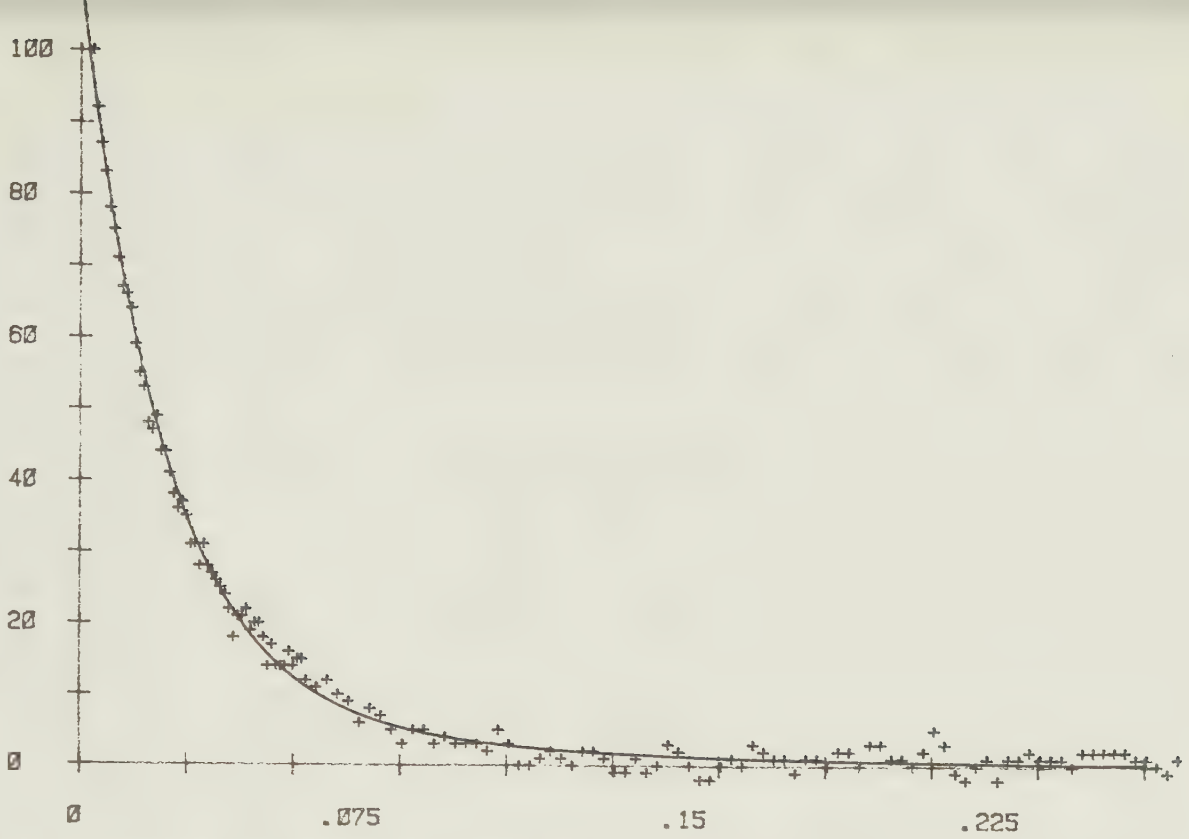

Abb.6: Anpassung mit Hilfe des RIP-Programms (durchgezogene Linie) an die gemessene Fluoreszenzkurve ($c_{HSA}=0,135\cdot10^{-4}{}_{M}{}^{-1}$ und $c_{DS}=0,025\cdot10^{-4}{}_{M}{}^{-1}$; in der Mischkammer). Diese Darstellung des einen Patienten ist repräsentativ für alle Konzentrationsbereiche der Patienten 1-14.

HSA·$10^{-4}M^{-1}$ / Patient	0,055	o,o92	o,135	0,27	0,54
1.R.H.	M 41,o5 / 39,01	M 46,04 / 41,92	*	M 56,34 / 58,38	D64,03
2.E.F.	38,5 / 34,76	43,32 / 41,57	48,43 / 46,67	72,69 / 72,8	D88,35
3.H.E.	M 39,8 / 36,19	M 45,99 / 41,5	M 48,77 / 46,44	M 58,84 / 64,27	M 76,33 / 72,09
4.H.L.	M 40,22 / 39,61	M 46,45 / 39,62	*	M 53,35 / 53,63	D58,8
5.L.W.	M 38,57 / 36,15	M 45,36 / 46,89	D50,6	M 67,95 / 65,44	M 105,89 / 82,57
6.C.D.	M 39,99 / 38,17	*	M 46,32 / 40,83	M 50,79 / 47,93	*
7.J.O.	M 41,57 / 44,33	M 50,55 / 49,58	M 65,33 / 59,86	M 7o,26 / 80,77	-
8.W.W.	D33,29	*	M 42,42 / 44,92	M 55,72 / 42,54	M 51,08 / 69,16
9.K.Z.	M 38,96 / 35,69	M 42,25 / 40,12	M 43,06 / 48,2	M 53,31 / 54,95	D63,83
10.T.S.	M 37,26 / 35,29	M 40,85 / 41,52	M 48,3 / 53,29	D64,3	D81,94
Median	38,53	42,78	48,25	58,61	74,21
Mittelwert	38,09	43,97	49,0	60,43	73,19
Standardabweichung	2,85	3,35	6,28	9,55	14,24

Tab.3: Ermittelte Doppelwerte der Relaxationskonstanten bei steigenden HSA-Konzentrationen (o,o55-0,54·$10^{-4}M^{-1}$ in der Mischkammer) und konstanter DS-Konzentration (0,025·$10^{-4}M^{-1}$; in der Mischkammer) für die Patientengruppe 1.
Eingabe der Relaxationskonstanten in den Rechner wie folgt:
M=doppelte Eingabe des Mittelwertes
D=doppelte Eingabe
*=Messung nicht auswertbar

1.W.F.	M 38,08 / 38,31	D 43,34	M 49,4 / 54,5	M 65,63 / 70,97	M 82,31 / 83,95
HSA·$10^{-4}M^{-1}$	0,056	0,093	0,128	0,267	0,557
2.F.N.	D 52,81	M 61,36 / 64,86	M 71,74 / 72,17	M 103,73 / 105,42	M 142,39 / 144,18
HSA·$10^{-4}M^{-1}$	0,052	0,086	0,119	0,247	0,515
3.R.L.	M 43,45 / 50,37	M 54,36 / 58,87	M 62,58 / 72,59	D 91,06	M 118,61 / 118,87
HSA·$10^{-4}M^{-1}$	0,058	0,097	0,135	0,281	0,585
4.R.B.	D 36,92	*	M 46,76 / 48,18	M 57,37 / 60,52	M 74,49 / 73,5
HSA·$10^{-4}M^{-1}$	0,052	0,086	0,119	0,247	0,515

Tab.4: Ermittelte Doppelwerte der Relaxationskonstanten bei unterschiedlichen HSA-Konzentrationen für die Patientengruppe 2 (Patienten 11-14). Angegeben ist die Konzentration des HSA in der Mischkammer bei konstanter DS-Konzentration ($0{,}025 \cdot 10^{-4} M^{-1}$; in der Mischkammer).
Eingabe der Relaxationskonstanten in den Rechner wie folgt:
M=doppelte Eingabe des Mittelwertes
D=doppelte Eingabe
*=Messung nicht auswertbar

Patient	SGOT U/l	SGPT U/l	AP U/l	γ-GT U/l	Harnsäure mg/dl	Harnstoff mg/dl	Bilirubin mg/dl	Eisen µg/dl	Calcium mmol/l	Chlorid mmol/l	Kalium mmol/l	Natrium mmol/l	Phosphat mg/dl
1.R.H.	6	17	94	8	5,8	140	0,3	63	2,5	100	6,2	14o	7,2
2.E.F.	9	18	142	26	8,4	140	o,4	73	2,5	105	5,5	143	*3
3.H.E.	3	7	106	9	7,4	170	0,4	135	2,6	105	6,3	139	6,5
4.H.L.	8	11	81	9	7,0	198	0,4	62	2,4	106	6,0	148	8,1
5.L.W.	9	11	174	12	7,6	139	o,5	86	2,4	108	4,5	138	5,6
6.C.D.	7	8	61	18	7,0	164	0,7	70	2,3	103	6,2	139	5,3
7.J.O.	8	13	73	12	8,6	164	0,5	77	2,3	101	5,3	141	6,2
8.W.W.	6	14	84	16	7,3	180	0,7	93	2,2	98	6,3	140	4,7
9.K.Z.	7	8	85	11	7,8	101	o,7	97	2,5	110	4,8	145	*3
10.F.S.	6	7	121	19	5,2	123	0,5	48	2,5	107	5,5	142	*3
11.W.F.	4	6	*1	*1	3,7	142	o,4	52	2,7	106	5,9	141	4,6*2
12.F.N.	8	5	270	12	7,7	184	0,4	144	2,6	98	5,4	139	6,1
13.R.L.	11	18	189	8	5,4	126	0,4	74	2,8	109	4,9	138	5,9
14.R.B.	7	17	70	5	6,3	153	0,4	84	2,3	105	5,5	139	3,9

Tab.5: Klinische Daten

*1=für die Bestimmung war nicht ausreichend Serum vorhanden

*2=Bestimmung ist nicht vom Untersuchungstag (liegt aber nicht mehr als 8 Tage zurück).

*3=Es erfolgt keine Angabe,da die letzte Bestimmung mehr als 8 Tage zurückliegt.

Patient / Referenzbereich	FFA mmol/l	Trigl mg/dl	Chol mg/dl	freies Chol mg/dl	freies Chol rel%	Cholester rel%	HDL mg/dl	HDL rel%	LDL mg/dl	LDL rel%	VLDL mg/dl	VLDL rel%	Typ nach Fredrickso
Referenzbereich	0,19-0,9	150(200)	220(260)		22-30%	70-78%		25-61		26-66		4-12	
1.R.H.	0,10	284	178	73	40,8	59,2	131	24,6	258	44,6	255	30,8	IV
2.E.F.	0,23	440	276	-	-	-	151	18	373	40,7	540	41,3	IV
3.H.E.	0,25	340	259	-	-	-	175	23,1	386	46,6	359	30,3	IV
4.H.L.	0,26	188	250	89	35,5	64,5	184	26,4	413	54,4	208	19,2	IIa
5.L.W.	0,30	293	245	-	-	-	161	23	380	49,7	299	27,3	IV
6.C.D.	o,37	768	228	107	46,8	53,2	138	17,3	208	23,9	731	58,8	IV
7.J.O.	0,41	143	304	-	-	-	282	32,7	499	53	192	14,3	IIa
8.W.W.	0,46	805	285	120	42	58	180	18	260	23,9	904	58,1	IV
9.K.Z.	0,48	98	175	-	-	-	332	54,7	216	32,6	120	12,7	normal
10.F.S.	0,50	128	159	-	-	-	219	43,2	221	40	133	16,8	normal
11.W.F.	0,19	180	345	159	46	54	282	29,5	579	55,5	224	15	IIa
12.F.N.	0,23	338	193	94	43,4	56,6	127	20,9	245	37	399	42,1	IV
13.R.L.	0,43	299	267	-	-	-	224	27,7	384	43,6	361	28,7	IV
14.R.B.	0,43	193	272	-	-	-	159	21,9	472	59,8	206	18,3	IIa

Tab.6: Klinische Daten

Patient	Diagnose	Gruppe	Stunden vergangen seit letzter Dialyse	Serum-Kreatinin (mg/dl)	Serum-Albumin (g/dl)	1.Kliniks-dialyse
1.R.H.	Chron. Pyelonephritis	PN	32,5	8,7	3,7	5/75
2.E.F.	Chron. Glomerulonephritis	GN	66,08	14,8	4,1	7/71
3.H.E.	Chron. Glomerulonephritis	GN	65,5	15,0	4,2	4/75
4.H.L.	Chron. Pyelonephritis	PN	64,17	12,4	3,9	3/74
5.L.W.	TNI unklarer Ätiologie	U	55,5	12,8	4,4	9/79
6.C.D.	Maligne Nephrosklerose	NSk	36,83	9,8	4,4	1/77
7.J.O.	Chron. interstitielle und destruierende Nephritis nach Phenacetinabusus -Parathyreoidektomie-	PN	63,83	11,4	4,2	1/82
8.W.W.	TNI unklarer Ätiologie	U	61,25	15,5	4,1	6/72
9.K.Z.	TNI unklarer Ätiologie	U	63,92	12,1	4,0	11/81
10.F.S.	Zystennieren	Z	29,5	9,2	3,9	12/76
11.W.F.	Maligne Nephrosklerose	NSk	43,75	8,3	4,0	11/79
12.F.N.	Urotuberkulose -Nephrektomie li.-	PN	43,42	11,6	4,3	2/81
13.R.L.	Chron. Pyelonephritis -Nephrektomie bds.-	PN	29,5	12,0	4,2	1/75
14.R.B.	Chron. Glomerulonephritis	GN	37,75	13,6	3,7	1/73

Tab.7: Klinische Daten

Die chronische interstitielle und destruierende Nephritis nach Phenacetinabusus und die Urotuberkulose wurden der Gruppe chron. Pyelonephritis (PN) zugeordnet.

Patient	Digitoxin	kolloidales Aluminiumhydroxid	Thiamindisulfid	Aluminiumsalicylat	Acetylsalicylsäure	Calcitriol	Folsäure	Multivitamin-Präparat (nur wasserlösliche Vit.)	zusätzlich eingenommene Medikamente (mg/die)
1.R.H.	0,1	7040	25	28o	5oo	0,5	5	ja	Testosteronpropionat 100/Woche
2.E.F.	0,07	8800	50	560	1000	0,25	15	ja	Verapamil-HCl 80,Isosorbiddinitrat 10, Prajmaliumbitartrat 40
3.H.E.	0,07	7920	12,5	140	250	0,25	-	ja	Isosorbiddinitrat 80,Nifedipin 30,Cimetidin 20,Bezafibrat 200 jd.3.Tag,Bromocriptin 1,25 jd.2.Tag,Pirenzepin-dihydrochlorid 25
4.H.L.	0,07	1392	-	-	-	0,5	-	nein	Dihydroergotamin6,Aluminium-und Magnesium-hydroxidgel nach Bedarf
5.L.W.	0,07	5280	-	-	-	-	-	nein	Mexiletin 4oo,Levothyroxin 50µg
6.C.D.	0,1	2640	-	-	-	-	-	ja	Propanolol 80,Catapressan n.B.,Thioctsäure 3oo
7.J.O.	o,o7	2375	-	280	500	0,25	-	ja	Thioctsäure 100,Bezafibrat 200 jd.3.Tag
8.W.W.	-	2640	-	-	-	-	-	nein	
9.K.Z.	-	3960	-	-	-	0,25	-	ja	Clonidin 3oo,Thioctsäure 3oo
1o.F.S.	0,1	5720	-	-	250	-	-	ja	
11.W.F.	0,07	1425	-	-	-	-	-	ja	Captopril 50,Isosorbiddinitrat 60, Bromazepam 1,5,Magnesiumaluminium-Salikat-hydrat 2808
12.F.N.	0,07	7200	-	280	5oo	-	-	ja	Pyridoxin 40,Isoniazid 400
13.R.L.	-	6160	-	-	-	-	-	ja	
14.R.B.	0,07	2640	-	-	250	-	-	ja	Piracetam 1200,Testosteronpropionat 250 alle 14 Tage,Midodrin n.Bedarf

Tab.8: Liste der verabreichten Medikamente

Konstanten \ Patienten		1.R.H.	2.E.F.	3.H.E.	4.H.L.	5.L.W.	6.C.D.	7.J.O.	8.W.W.	9.K.Z.	10.T.S.	Median
$K_A' \cdot 10^4$	M^{-1}	4,44	3,02	2,94	3,79	3,12	1,1	4,14	2,9	3,7	2,42	3,07
k_2	s^{-1}	53,08	109,53	82,99	43,5	110,28	66,98	109,92	63,42	57,76	113,26	74,98
$k_2 \cdot K_A' \cdot 10^6$	$M^{-1}s^{-1}$	2,35	3,31	2,44	1,65	3,44	0,73	4,55	1,84	2,14	2,74	2,39
k_{-2} (Bindung)	s^{-1}	28	20	25	31	21	34	22	23	26	21	24
k_{-2} (Verdrängung)	s^{-1}	20	33	21	20	18	32	20	24	20	18	20
$K_A \cdot 10^5$	M^{-1}	0,84	1,66	0,98	0,53	1,64	0,22	2,07	0,8	0,82	1,3	0,91

Tab.9: Vergleich der kinetischen Konstanten der DS-HSA-Komplexbildung, ermittelt aus den stopped-flow Bindungs- und Verdrängungsmessungen, sowie der Affinitätskonstanten, ermittelt aus der Fluoreszenz im Bindungsgleichgewicht für die Patientengruppe 1.

Konstanten \ Patienten		11.W.F.	12.F.N.	13.R.L.	14.R.B.	Median (einschließlich der Patienten 1-10)
$K'_A \cdot 10^4$	M^{-1}	3,01	3,47	1,57	4,51	3,41
k_2	s^{-1}	104,69	146,56	243,85	74,38	93,84
$k_2 \cdot K'_A \cdot 10^6$	$M^{-1}s^{-1}$	3,15	5,08	3,82	3,36	2,94
k_{-2}	s^{-1}	22	22	30	22	22,5
$K_A \cdot 10^5$	M^{-1}	1,43	2,3	1,27	1,53	1,28

Tab.10: Vergleich der kinetischen Konstanten der DS-HSA-Komplexbildung, ermittelt aus den stopped-flow Bindungsmessungen, sowie der Affinitätskonstanten für die Patientengruppe 2.
Angegeben der Median, welcher sich aus den Ergebnissen der Konstanten der einzelnen Patienten errechnet, einschließlich der Patienten 1-10.

Abschließend danke ich Herrn Prof. Dr. med. N. Rietbrock für die freundliche Überlassung des Themas, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und die wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. W. Schoeppe danke ich für sein Interesse an dem Thema und die vorbildliche Unterstützung des ihm unterstellten Kuratoriums für Heimdialyse e.V.. Ich danke Herrn OA P. B. Bechstein, welcher mir die Patienten zwecks Durchführung der vorliegenden Dissertation zuführte und medizinisch mitbetreute.

Mein Dank gilt Herrn Dr. A. Laßmann für die methodische Betreuung sowie Herrn Dr. med. R. Lissner für die klinische Betreuung. Herrn W. Kratzer danke ich für Unterstützung bei der Durchführung der stopped-flow Messungen.

Mein ausdrücklicher Dank gehört den Patienten, sowie allen Beteiligten, die die vorliegende Arbeit ermöglichten und mich bei der Durchführung unterstützten.

Für gute Zusammenarbeit danke ich Herrn cand. med. R. Ulrich, welcher im Rahmen seiner Dissertation die Seren der nierengesunden Probanden untersuchte. Meinen Freunden B. Völker und M. Kester danke ich für so manchen guten Rat in gemeinsamen Gesprächen.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

"DAS BINDUNGSVERHALTEN VON HUMANSERUMALBUMIN BEI PATIENTEN MIT TERMINALER NIERENINSUFFIZIENZ"

im Zentrum der Pharmakologie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. N. Rietbrock mit Unterstützung durch Herrn Dr. Laßmann und Herrn Dr. med. Lissner ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 19. Mai 1983

W. v. Pittwitz

L E B E N S L A U F

Am 13. Dezember 1955 wurde ich in Swakopmund/SW-Afrika geboren. Von 1963 bis 1966 besuchte ich die Grundschule und anschließend das Helmholtz-Gymnasium in Frankfurt, wo ich 1975 die Reifeprüfung ablegte. Zum WS 1975/76 war ich in dem Studiengang Geophysik an der J.W.Goethe-Universität immatrikuliert. Von April 1976 bis April 1977 leistete ich meinen Grundwehrdienst ab.

Im Jahre 1977 nahm ich an der J.W.Goethe-Universität das Studium der Humanmedizin auf. Im November 1982 waren die Voraussetzungen zur Erteilung der Approbation erfüllt. Nach erfolgreichem Abschluß des Studiums arbeitete ich in der klinischen Pharmakologie an meiner Dissertation und an Veröffentlichungen.

Voraussichtlich werde ich ab Juni 1983 eine Assistenzarztstelle in der inneren Medizin antreten.

W. v. Pittwitz